Το παρόν έγγραφο αποτελεί απλώς βοήθημα τεκμηρίωσης και τα θεσμικά όργανα δεν αναλαμβάνουν καμία ευθύνη για το περιεχόμενό του

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

της 30ής Μαΐου 2008

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

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(ΕΕ L 142 της 31.5.2008, σ. 1)

Τροποποιείται από:

		Επίσημη Εφημερίδα		
		αριθ.	σελίδα	ημερομηνία
►**M1**	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 761/2009 της Επιτροπής της 23ης Ιουλίου 2009	L 220	1	24.8.2009
►**M2**	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1152/2010 της Επιτροπής της 8ης Δεκεμβρίου 2010	L 324	13	9.12.2010
►**M3**	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 640/2012 της Επιτροπής της 6ης Ιουλίου 2012	L 193	1	20.7.2012
►**M4**	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 260/2014 της Επιτροπής της 24ης Ιανουαρίου 2014	L 81	1	19.3.2014

▼B

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 440/2008 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 30ής Μαΐου 2008

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

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη: τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ ([1]), και ιδίως το άρθρο 13 παράγραφος 3,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, θεσπίζονται μέθοδοι δοκιμής σε κοινοτικό επίπεδο για τους σκοπούς δοκιμής επί υλικών, όποτε οι δοκιμές αυτές απαιτούνται για την άντληση πληροφοριών σχετικά με τις εγγενείς ιδιότητες των ουσιών.

(2) Η οδηγία 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 27ης Ιουνίου 1967, περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν στην ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικινδύνων ουσιών ([2]), καθορίζει, στο παράρτημα V, μεθόδους προσδιορισμού των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας ουσιών και παρασκευασμάτων. Με την οδηγία 2006/121/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου καταργείται, από 1ης Ιουνίου 2008, το παράρτημα V της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ.

(3) Οι μέθοδοι δοκιμής που περιέχονται στο παράρτημα V της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ θα πρέπει να ενσωματωθούν στον παρόντα κανονισμό.

(4) Ο παρών κανονισμός δεν αποκλείει τη χρήση άλλων μεθόδων δοκιμής, υπό τον όρο ότι αυτή διενεργείται σύμφωνα με το άρθρο 13 παράγραφος 3 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006.

([1]) ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1, όπως διορθώθηκε στην ΕΕ L 136 της 29.5.2007, σ. 3.

([2]) ΕΕ 196 της 16.8.1967, σ. 1. Οδηγία όπως τροποποιήθηκε τελευταία με την οδηγία 2006/121/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 850· όπως διορθώθηκε στην ΕΕ L 136 της 29.5.2007, σ. 281).

▼B

(5) Στο σχεδιασμό των μεθόδων δοκιμής πρέπει να συνεκτιμώνται πλήρως οι αρχές της αντικατάστασης, της μείωσης και του εξευγενισμού της χρήσης ζώων στις αντίστοιχες διαδικασίες, ιδιαίτερα όταν καθίστανται διαθέσιμες κατάλληλες επικυρωμένες μέθοδοι ώστε να αντικαθίσταται, να μειούται ή να εξευγενίζεται η διεξαγωγή δοκιμών σε ζώα.

(6) Οι διατάξεις του παρόντος κανονισμού είναι σύμφωνες με τη γνώμη της επιτροπής που συγκροτήθηκε δυνάμει του άρθρου 133 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

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

Άρθρο 2

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

Άρθρο 3

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

Άρθρο 4

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

Εφαρμόζεται από την 1η Ιουνίου 2008.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΜΕΡΟΣ Α: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Α.1.	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΤΗΞΕΩΣ/ΠΗΞΕΩΣ
Α.2.	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΖΕΣΕΩΣ
Α.3.	ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ
Α.4.	ΤΑΣΗ ΑΤΜΩΝ
Α.5.	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΤΑΣΗ
Α.6.	ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ
Α.8.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ
Α.9.	ΣΗΜΕΙΟ ΑΝΑΦΛΕΞΗΣ
Α.10.	ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΣΤΕΡΕΑ)
Α.11.	ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΑΕΡΙΑ)
Α.12.	ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΣΕ ΕΠΑΦΗ ΜΕ ΝΕΡΟ)
Α.13.	ΠΥΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΣΤΕΡΕΩΝ ΚΑΙ ΥΓΡΩΝ
Α.14.	ΕΚΡΗΚΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
Α.15.	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΥΤΑΝΑΦΛΕΞΗΣ ΓΙΑ ΥΓΡΑ ΚΑΙ ΑΕΡΙΑ
Α.16.	ΣΧΕΤΙΚΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΥΤΑΝΑΦΛΕΞΗΣ ΓΙΑ ΣΤΕΡΕΑ
Α.17.	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ (ΣΤΕΡΕΑ)
Α.18.	ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ
Α.19.	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ
Α.20.	ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΔΙΑΛΥΣΗΣ/ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ
Α.21.	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ (ΥΓΡΑ)
Α.22.	ΣΤΑΘΜΙΣΜΕΝΟΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΜΗΚΟΣ, ΓΕΩΜΕΤΡΙΚΟΣ ΜΕΣΟΣ ΤΩΝ ΔΙΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΙΝΩΝ

▼M4

Α.23.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ (ΟΚΤΑΝΟΛΗ-1/ΝΕΡΟ): ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΑΡΓΗΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ

▼B

Α.1. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΤΗΞΕΩΣ/ΠΗΞΕΩΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

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

Μετατροπή μονάδων (K σε ^{o}C)

$t = T - 273,15$

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

T: θερμοδυναμική θερμοκρασία, Κέλβιν (K)

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

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

▼B

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

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

1.4.1. **Μέθοδος τριχοειδούς**

1.4.1.1. *Συσκευή θερμοκρασίας τήξεως με υγρό λουτρό*

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

1.4.1.2. *Συσκευή θερμοκρασίας τήξεως με μεταλλικό κορμό*

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

1.4.1.3. *Ανίχνευση με φωτοκύτταρο*

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

1.4.2. **θερμές επιφάνειες**

1.4.2.1. *θερμή ράβδος Kofler*

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

▼B

1.4.2.2. *Μικροσκόπιο τήξεως*

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

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

1.4.2.3. *Μέθοδος μηνίσκου*

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ειδικά για πολυαμίδια.

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

1.4.3. **Μέθοδος προσδιορισμού της θερμοκρασίας πήξεως**

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

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

1.4.4. **Θερμική ανάλυση**

1.4.4.1. *Διαφορική θερμική ανάλυση (ΔΘΑ)*

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

▼B

1.4.4.2. *Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (ΘΑΣ)*

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

1.4.5. **Σημείο ροής**

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

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

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

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

ΠΙΝΑΚΑΣ: ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

A. **Μέθοδοι τριχοειδούς**

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

[1] Εξαρτώμενη από τον τύπο του οργάνου και το βαθμό καθαρότητας της ουσίας.

▼B

Β. **Θερμές επιφάνειες και μέθοδοι πήξεως**

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

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

Γ. **Θερμική ανάλυση**

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

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

Δ. **Σημείο ροής**

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

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

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

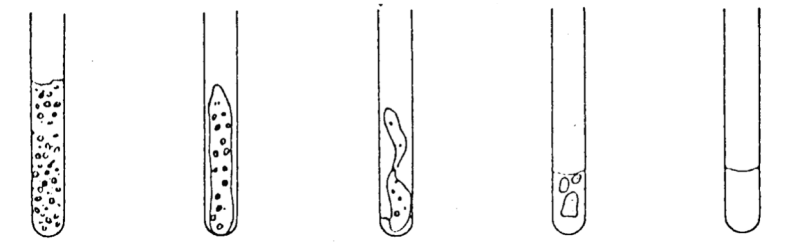
Η τεχνική σχεδόν όλων των μεθόδων δοκιμής περιγράφεται σε εθνικά και διεθνή πρότυπα (βλέπε προσάρτημα 1).

1.6.1. **Μέθοδοι με τριχοειδή σωλήνα**

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

▼B

Εικόνα 1



Στάδιο A (Αρχή της τήξεως): Λεπτά σταγονίδια προσκολλώνται ομοιόμορφα στο εσωτερικό τοίχωμα του τριχοειδούς σωλήνα.

Στάδιο B Εμφανίζεται ένα διάκενο μεταξύ του δείγματος και του εσωτερικού τοιχώματος λόγω της συρρίκνωσης του τήγματος.

Στάδιο Γ Το συρρικνωθέν δείγμα αρχίζει να καταρρέει και να υγροποιείται.

Στάδιο Δ Στην επιφάνεια του δείγματος δημιουργείται ένας πλήρης μηνίσκος, σημαντική όμως ποσότητα του δείγματος παραμένει στερεά.

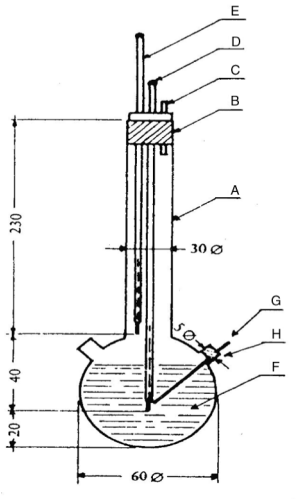
Στάδιο E (Τελικό στάδιο τήξεως): δεν υπάρχουν καθόλου στερεά σωματίδια.

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

1.6.1.1. *Συσκευές θερμοκρασίας τήξεως με υγρό λουτρό*

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

Εικόνα 2



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

▼B

Υγρό λουτρό:

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

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

Θερμόμετρο:

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

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

Διαδικασία:

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

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

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

Υπολογισμός:

Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας τήξεως γίνεται όπως παρακάτω:

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

όπου:

T = διορθωμένη θερμοκρασία τήξεως σε K

T_D = ένδειξη θερμοκρασίας θερμομέτρου D σε K

T_E = ένδειξη θερμοκρασίας θερμομέτρου E σε K

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

1.6.1.2. *Συσκευές θερμοκρασίας τήξεως με μεταλλικό κορμό*

Συσκευή:

Η συσκευή αποτελείται από:

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

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

▼B

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

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

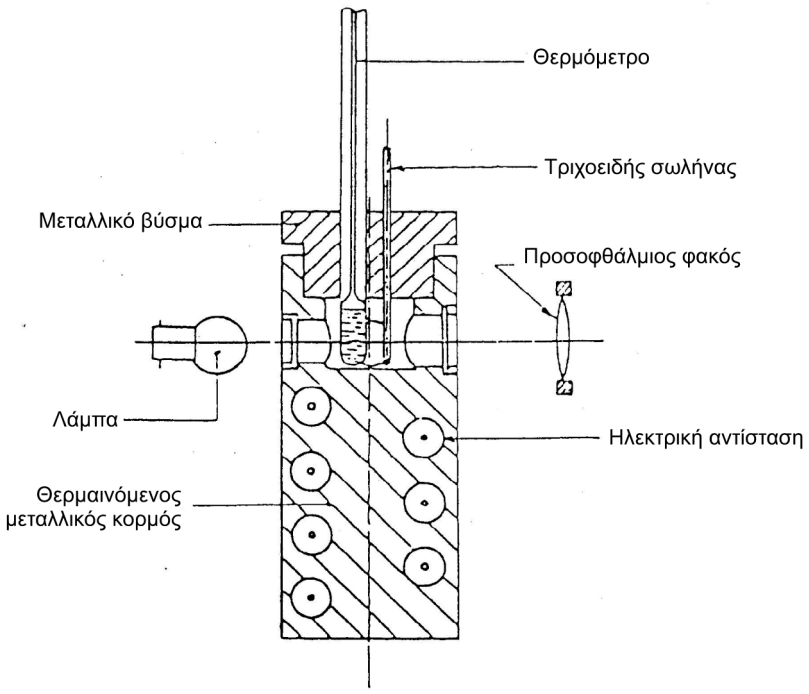
— τέσσερα παράθυρα, από γυαλί ανθεκτικό στη θερμότητα, πάνω στα όρθια τοιχώματα του θαλάμου, διαμετρικά τοποθετημένα σε ορθή γωνία μεταξύ τους. Εμπρός από το ένα από τα παράθυρα αυτά είναι στερεωμένος ένας προσοφθάλμιος φακός για παρατήρηση του τριχοειδή σωλήνα. Τα άλλα τρία παράθυρα χρησιμεύουν για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

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

Θερμόμετρο:

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

Εικόνα 3



1.6.1.3. *Προσδιορισμός με φωτοκύτταρο*

Συσκευή και διαδικασία:

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

▼B

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

1.6.2. **Θερμές επιφάνειες**

1.6.2.1. *Θερμή επιφάνεια Kofler*

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.2.2. *Μικροσκόπιο τήξεως*

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.2.3. *Μέθοδος μηνίσκου (πολυαμίδια)*

Βλέπε προσάρτημα.

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

1.6.3. **Μέθοδοι προσδιορισμού της θερμοκρασίας πήξεως**

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.4. **θερμική ανάλυση**

1.6.4.1. *Διαφορική θερμική ανάλυση*

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.4.2. *θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης*

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.5. **Προσδιορισμός του σημείου ροής**

Βλέπε προσάρτημα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι αναγκαία η διόρθωση του θερμομέτρου,

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

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

— Π χρησιμοποιηθείσα μέθοδος,

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

— εκτίμηση της ακρίβειας (accuracy).

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

▼B

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

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

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

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

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

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

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

▼B

Προσάρτημα

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

1. **Μέθοδοι τριχοειδούς**

1.1. Συσκευές θερμοκρασίας τήξεως με υγρό λουτρό

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

1.2. Συσκευές θερμοκρασίας τήξεως με μεταλλικό κορμό

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

2. **Θερμές επιφάνειες**

2.1. Θερμή ράβδος Kofier

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

2.2. Μικροσκόπιο τήξεως

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Μέθοδος μηνίσκου (πολυαμίδια)

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

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resine injection moulding and extrusion materials
NT T 51-050	Resines de polyamides. Determination du «point de fusion». Methode du menisque

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

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

4. **Θερμική ανάλυση**

4.1. Διαφορική θερμική ανάλυση

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

▼B

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

4.2. Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης

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

5. **Προσδιορισμός του σημείου ροής**

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

▼B

Α.2. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΖΕΣΕΩΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

Παρατηρήσεις:

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

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

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

όπου:

p = η τάση ατμών της ουσίας σε πασκάλ

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

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

T = η θερμοδυναμική θερμοκρασία σε K

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

▼B

Μετατροπές:

Πίεση (μονάδες: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

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

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

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

1 atm = πρότυπη ατμόσφαιρα = 101 325 Pa

(η μονάδα «atm» δεν επιτρέπεται).

Θερμοκρασία (μονάδες: K)

$t = T - 273,15$

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

T: θερμοδυναμική θερμοκρασία, Κέλβιν (K)

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

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

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

1.4.1. **Προσδιορισμός με τη χρήση ζεσεομέτρου**

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

1.4.2. **Δυναμική μέθοδος**

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

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

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

▼B

1.4.4. **Μέθοδος κατα Siwoloboff**

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

1.4.5. **Προσδιορισμός με φωτοκύτταρο**

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

1.4.6. **Διαφορική θερμική ανάλυση**

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

1.4.7. **Σάρωση διαφορική θερμιδομετρίας**

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

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

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

Πινακας 1:

Σύγκριση των μεθόδων

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

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

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

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

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

1.6.1. **Ζεσεόμετρο**

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.2. **Δυναμική μέθοδος**

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

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

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

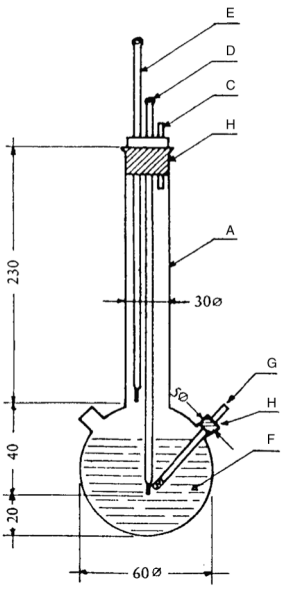
Βλέπε προσάρτημα.

1.6.4. **Μέθοδος κατά Siwoloboff**

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

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

Εικόνα 1



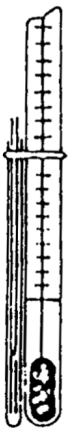
A: Δοχείο μέτρηση;
B: Πώμα
C: Αερισμός
D: Θερμόμετρο
E: Βοηθητικό θερμόμετρο
F: Υγρό λουτρό
G: Σωλήνας δείγματος με εξωτερική διάμετρο 5 mm κατ' ανώτατο όριο περιέχων τριχοειδή σωλήνα, μήκους περίπου 100 mm, εσωτερικής διαμέτρου περίπου 1 mm και πάχους τοιχώματος περίπου 0,2 έως 0,3 mm
H: Πλευρικός σωλήνας

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

▼B

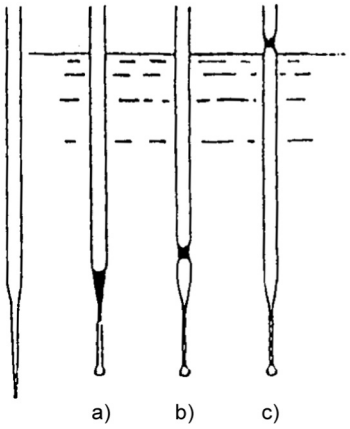
Εικόνα 2

Αρχή κατά Siwoloboff



Εικόνα 3

Τροποποιημένη αρχή



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

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

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

1.6.5. **Προσδιορισμός με φωτοκύτταρο**

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

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

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

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

▼B

1.6.6. **Θερμική ανάλυση**

1.6.6.1. *Διαφορική θερμική ανάλυση*

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.6.2. *Σάρωση διαφορικής θερμιδομετρίας*

Βλέπε προσάρτημα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

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

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

όπου:

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

p = μέτρηση πίεσης σε kPa,

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

T = μετρούμενη θερμοκρασία ζέσεως σε K

T_n = θερμοκρασία ζέσεως διορθωμένη σε κανονική πίεση σε K

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

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

Πίνακας 2

Συντελεστές διόρθωσης θερμοκρασίας (f_T)

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

▼B

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

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

— τη χρησιμοποιηθείσα μέθοδο,

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

— εκτίμηση της ορθότητας.

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

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

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

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

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

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

▼B

Προσάρτημα

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

1. **Ζεσεόμετρο**

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

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

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

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

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

▼B

Α.3. ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

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

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

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (1) (3)

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

1.4. ΑΡΧΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Χρησιμοποιούνται τέσσερεις τάξεις μεθόδων.

1.4.1. **Μέθοδοι άνωσης**

1.4.1.1. *Υδρόμετρο* (για υγρές ουσίες)

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

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

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

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

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

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

▼B

1.4.2. **Μέθοδοι πυκνομέτρου**

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

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

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

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

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

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

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

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

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

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

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Βλέπε πρότυπα.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

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

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδο,

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

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

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

▼B

ΠΙΝΑΚΑΣ:

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

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

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Προσάρτημα

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

1. **Μέθοδοι άνωσης**

1.1. Υδρόμετρο

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

1.2. Υδροστατικός ζυγός

Για στερεές ουσίες

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

Για υγρές ουσίες

ISO 901	ISO 758

▼B

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

1.3. Μέθοδος βυθιζόμενου σώματος

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

2. **Μέθοδοι πυκνομέτρου**

2.1. Για υγρές ουσίες

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

▼B

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

▼B

2.2. Για στερεές ουσίες

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

3. **Συγκριτικό πυκνόμετρο αέρα**

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

▼M1

Α.4. ΤΑΣΗ ΑΤΜΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

Πίνακας 1

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

(1) Όταν χρησιμοποιείται μανόμετρο χωρητικότητας.

1.3. ΑΡΧΗ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΜΕΝΗ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ

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

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

όπου:

p = η τάση ατμών σε πασκάλ

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

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

T: = η θερμοκρασία σε βαθμούς K

▼**M1**

1.4. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

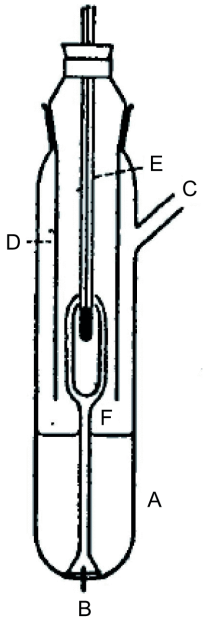
1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

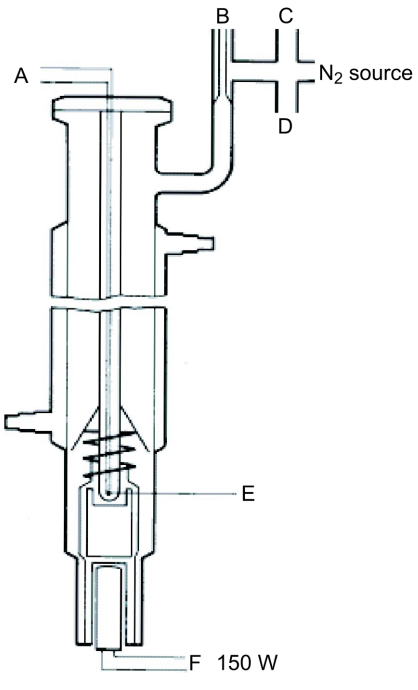
1.5.1.1. *Αρχή*

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

Σχήμα 1



Σχήμα 2



▼**M1**

Αντλία Cottrell (4)

A: Θερμοηλεκτρικό στοιχείο

B: Παρένθετος θάλαμος κενού

C: Μετρητής πίεσης

D: Κενό

E: Σημείο μέτρησης

F: Θερμαντικό στοιχείο ισχύος περίπου 150 W

1.5.1.2. *Συσκευές*

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

1.5.1.3. *Διαδικασία*

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

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

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

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

1.5.2. **Στατική μέθοδος**

1.5.2.1. *Αρχή*

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

▼**M1**

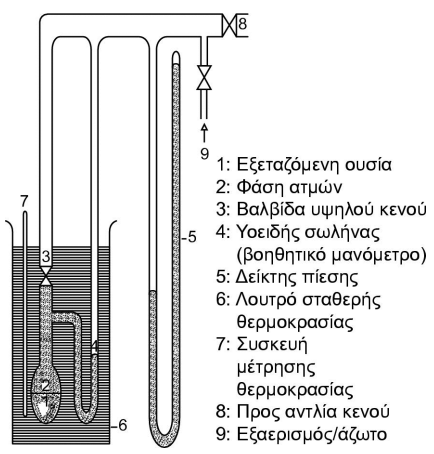
1.5.2.2. *Συσκευές*

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

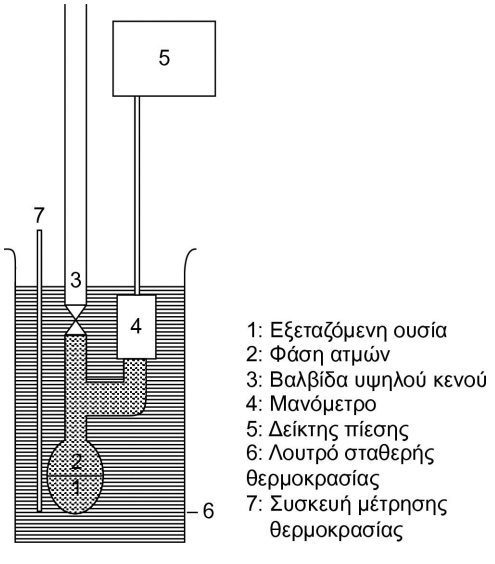
1.5.2.3. *Διαδικασία*

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

Σχήμα 3α



Σχήμα 3β



▼**M1**

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

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

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

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

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

1.5.3. **Μέθοδος ισοτενισκοπίου**

1.5.3.1. *Αρχή*

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

1.5.3.2. *Συσκευές*

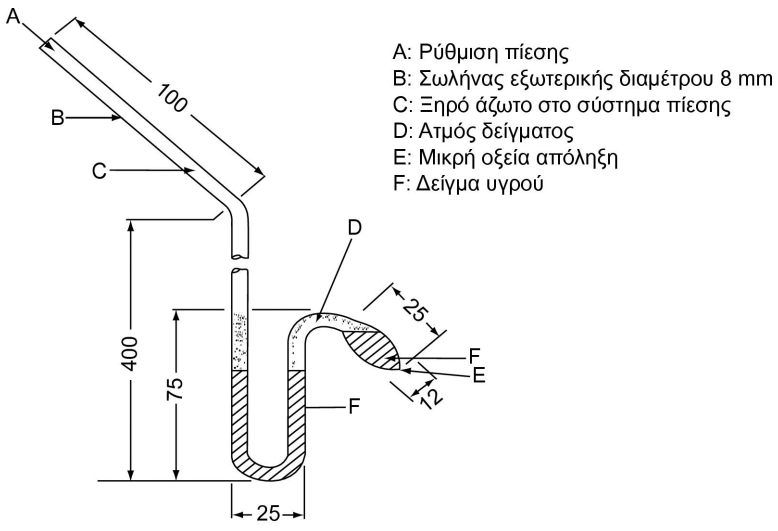
Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται παράδειγμα συσκευής μέτρησης. Πλήρης περιγραφή περιέχεται στο ASTM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Διαδικασία*

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

Σχήμα 4



(Διαστάσεις σε mm)

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

▼**M1**

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

1.5.4.1. *Αρχή*

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

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

όπου:

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

M = μοριακή μάζα (g mol^{-1})

T = θερμοκρασία (K)

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

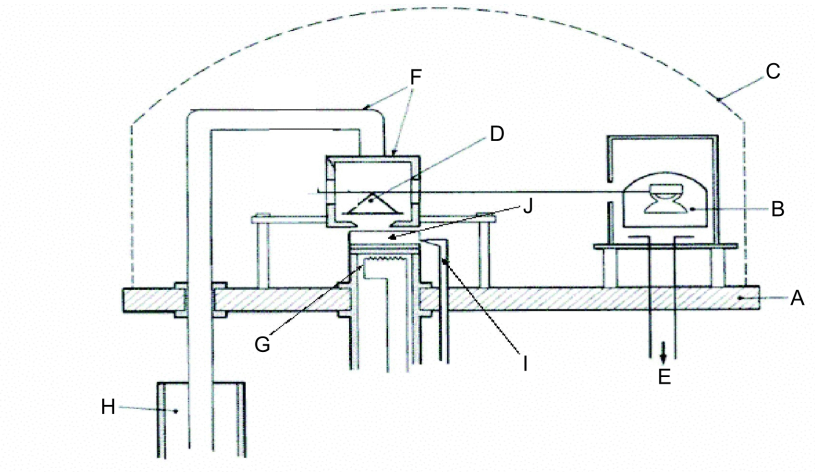
p = τάση ατμών (Pa)

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

1.5.4.2. *α) Συσκευές*

Η γενική αρχή της συσκευής παρουσιάζεται στο σχήμα 5.

Σχήμα 5



A: Πλάκα βάσης

B: Όργανο κινητού πηνίου

C: Γυάλινος κώδωνας

D: Ζυγός με δίσκο ζύγισης

E: Συσκευή μέτρησης κενού

F: Κιβώτιο ψύξης και ψυκτική ράβδος

G: Κλίβανος για εξάτμιση

H: Δοχείο Ντιούαρ με υγρό άζωτο

I: Μέτρηση θερμοκρασίας δείγματος

J: Εξεταζόμενη ουσία

▼**M1**

1.5.5. **Μέθοδος έκχυσης: κυψελίδα Κνούντσεν**

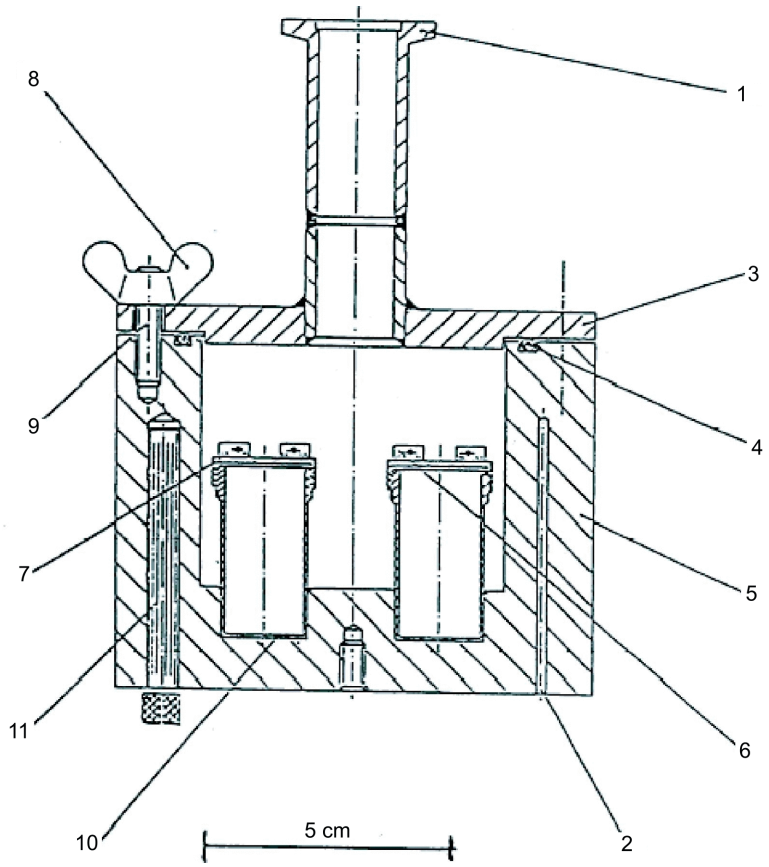
1.5.5.1. *Αρχή*

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

1.5.5.2. *Συσκευές*

Η γενική αρχή της συσκευής παρουσιάζεται στο σχήμα 6.

Σχήμα 6



1: Σύνδεση προς κενό

2: Κοιλότητες από θερμόμετρο αντίστασης λευκοχρύσου

3: Κάλυμμα για δοχείο κενού

4: Δακτύλιος Ο

5: Δοχείο κενού από αλουμίνιο

6: Συσκευή για τοποθέτηση και αφαίρεση των κυψελίδων έκχυσης

7: Κοχλιοτομημένο κάλυμμα

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

9: Αμφικόχλια (βίδες με παξιμάδια)

10: Κυψελίδες έκχυσης από ανοξείδωτο χάλυβα

11: Θερμαντικό στοιχείο

▼**M1**

1.5.6. **Μέθοδος έκχυσης: ισόθερμη θερμοβαρυμετρία**

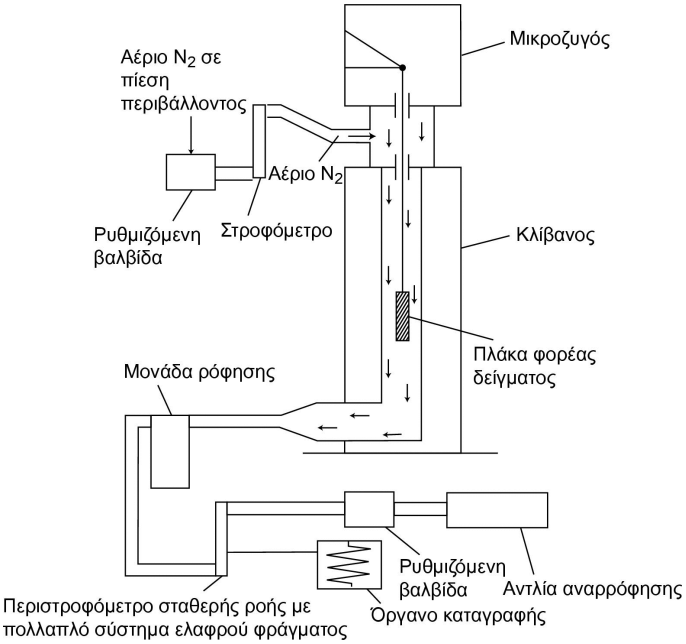
1.5.6.1. *Αρχή*

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

1.5.6.2. *Συσκευές*

Στο σχήμα 7 παρουσιάζεται η γενική αρχή της πειραματικής διάταξης.

Σχήμα 7



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

1.5.6.3. *Διαδικασία*

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.7.1. *Αρχή*

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

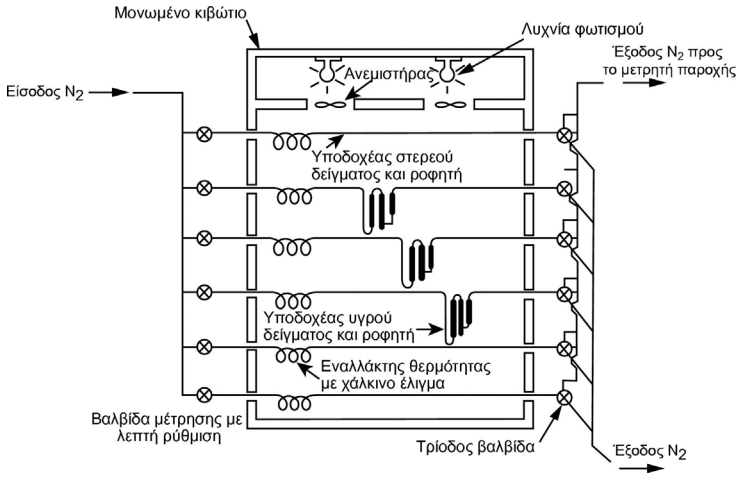
Η διαδικασία κορεσμού αερίου μπορεί να εφαρμόζεται για στερεές ή υγρές ουσίες. Είναι δυνατή η χρήση της για τάσεις ατμών χαμηλές μέχρι 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Η μέθοδος παρουσιάζει τη μέγιστη αξιοπιστία για τάσεις ατμών κάτω των 10^3 Pa. Άνω των 10^3 Pa οι τάσεις ατμών γενικώς υπερεκτιμώνται,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

1.5.7.2. *Συσκευές*

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

▼**M1**

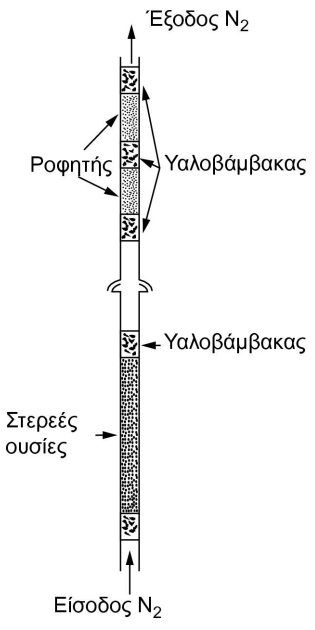
Σχήμα 8



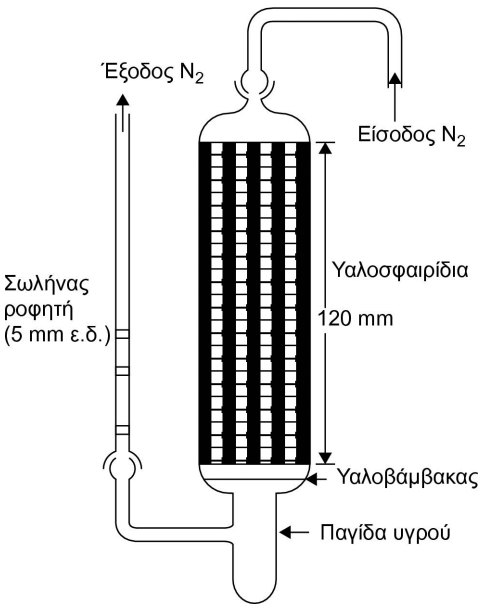
Γενικώς, ως αδρανής αέριος φορέας χρησιμοποιείται το άζωτο αλλά, περιστασιακά, είναι δυνατόν να απαιτείται κάποιο άλλο αέριο (24). Ο αέριος φορέας πρέπει να είναι ξηρός. Το αέριο ρεύμα διαχωρίζεται σε 6 ρεύματα, ελεγχόμενα από βαλβίδες βελόνας (οπής περίπου 0,79 mm), και εισρέει στο κιβώτιο μέσω χάλκινου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

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

Σχήμα 9



Σχήμα 10



▼**M1**

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

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

1.5.7.3. *Διαδικασία*

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

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

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

Η τάση ατμών υπολογίζεται με την εξίσωση:

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

όπου:

p = η τάση ατμών (Pa)

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

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

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

T = η θερμοκρασία (K)

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

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

▼**M1**

1.5.8. **Περιδινούμενος στροφέας**

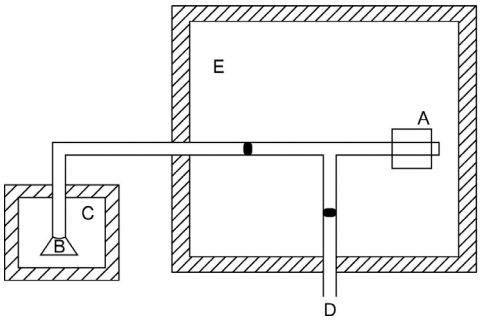
1.5.8.1. *Αρχή*

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

1.5.8.2. *Συσκευές*

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

Σχήμα 11



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

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

2.1. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

2.2. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος,

▼**M1**

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

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

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

— όλα τα αρχικά δεδομένα,

— καμπύλη του log p συναρτήσει του 1/Τα,

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

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

— φύση της μεταβολής,

— θερμοκρασία στην οποία επέρχεται η μεταβολή υπό ατμοσφαιρική πίεση,

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

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

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

▼**M1**

Προσάρτημα

Μέθοδος εκτίμησης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ

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

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

Η τάση ατμών υπολογίζεται με τους τύπους:

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

όπου:

T = η ζητούμενη θερμοκρασία

T_b = το κανονικό σημείο ζέσεως

P_{vp} = η τάση ατμών σε θερμοκρασία T

ΔH_{Vb} = η θερμότητα εξάτμισης

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

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

και, στη συνέχεια,

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

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

▼**M1**

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

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

όπου T_1 είναι το σημείο ζέσεως στη μειωμένη πίεση P_1.

ΕΚΘΕΣΗ

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

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

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

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

▼B

Α.5. ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΤΑΣΗ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

Η επιφανειακή τάση δίνεται σαν:

N/m (μονάδα SI) ή

mN/m (υπομονάδα SI)

1 N/m = 10^3 δύνες/cm

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

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

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

1.4. ΑΡΧΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

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

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

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

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

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

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

1.6.1. **Μέθοδος δίσκου**

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

1.6.2. **Μέθοδος αναβολέα**

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

1.6.3. **Μέθοδος δακτυλίου**

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

1.6.4. **Εναρμονισμένη μέθοδος δακτυλίου του OOLA**

1.6.4.1. *Συσκευή*

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

— κινητό τραπέζι δείγματος,

— σύστημα μέτρησης δύναμης,

— σώμα μέτρησης (δακτύλιος),

— δοχείο μέτρησης.

1.6.4.1.1. Κινητό τραπέζι δείγματος

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

1.6.4.1.2. Σύστημα μέτρησης της δύναμης

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

▼B

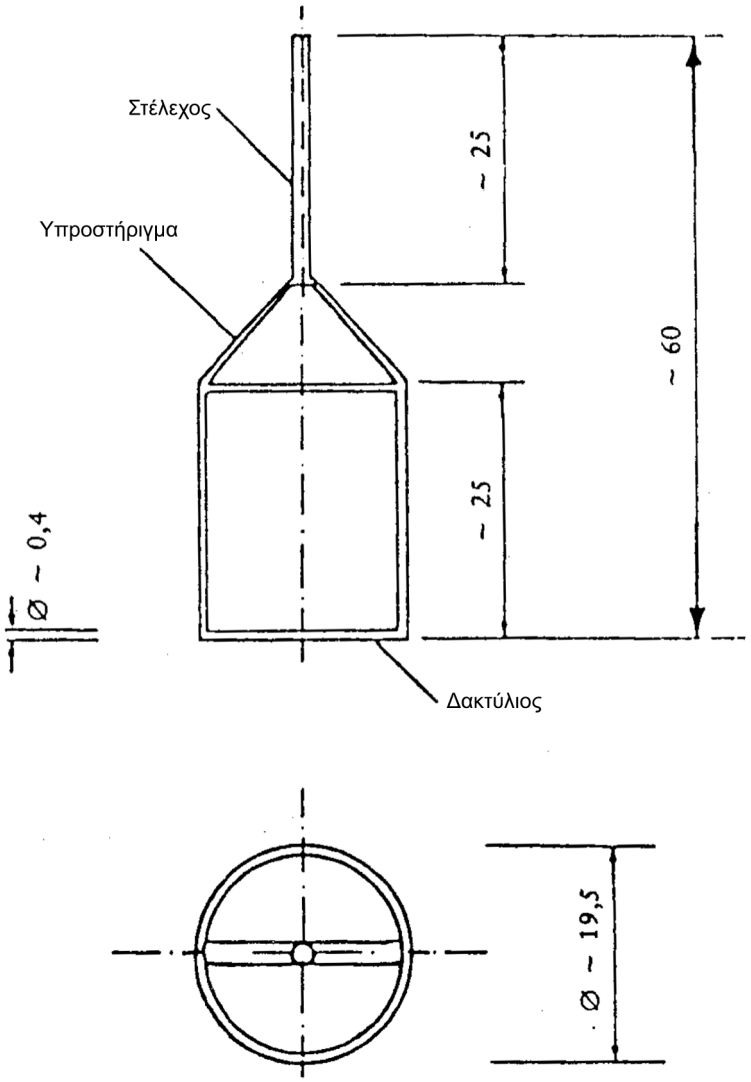
1.6.4.1.3. Σώμα μέτρησης (δακτύλιος)

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

Εικόνα

Σώμα μέτρησης

(Όλες οι διαστάσεις εκφρασμένες σε mm)



1.6.4.1.4. Δοχείο μέτρησης

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

▼B

1.6.4.2. *Προετοιμασία τη συσκευής*

1.6.4.2.1. Καθαρισμός

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

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

Σημείωση:

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

1.6.4.2.2. Βαθμονόμηση της συσκευής

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

Συναρμολόγηση:

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

Ρύθμιση του μηδενικού σημείου:

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

Βαθμονομήσεις:

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

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

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

όπου:

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

m = μάζα του ιππέα (g)

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

b = μέση περιφέρεια του δακτυλίου (cm^1)

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

▼B

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

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

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

όπου:

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

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

1.6.4.3. *Παρασκευή των δειγμάτων*

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

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

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

1.6.5. **Συνθήκες δοκιμής**

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

1.6.6. **Εκτέλεση της δοκιμής**

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

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

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

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

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

Πίνακας

Διόρθωση της μετρηθείσας επιφανειακής τάσεως

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

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

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

▼B

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

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

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

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

όπου:

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

R = η ακτίνα του δακτυλίου,

f = ο συντελεστής διόρθωσης (1).

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος,

— τύπος του νερού ή του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε,

— επακριβή καθορισμό της ουσίας (ταυτότητα και προσμείξεις),

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

▼B

— συγκέντρωση του διαλύματος,

— θερμοκρασία τη δοκιμής,

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

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

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

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

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

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

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

▼M4

Α.6. **ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

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

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

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

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

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Συνθήκες δοκιμής

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

Προκαταρκτική δοκιμή

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

▼M4

ουσίας. Όταν η διαλυτότητα είναι χαμηλή, ενδέχεται να απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για να διαλυθεί μια ελεγχόμενη ουσία και θα πρέπει να προβλέπονται τουλάχιστον 24 ώρες. Εάν, μετά από 24 ώρες, η ελεγχόμενη ουσία είναι ακόμη αδιάλυτη, θα πρέπει να αφήνεται για περισσότερο χρόνο (96 ώρες κατ' ανώτατο όριο) ή θα πρέπει να επιχειρείται περαιτέρω αραίωση για να εξακριβωθεί αν θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος έκλουσης στήλης ή η μέθοδος της φιάλης.

Πίνακας 1

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

Μέθοδος έκλουσης στήλης

Αρχή

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

Συσκευές

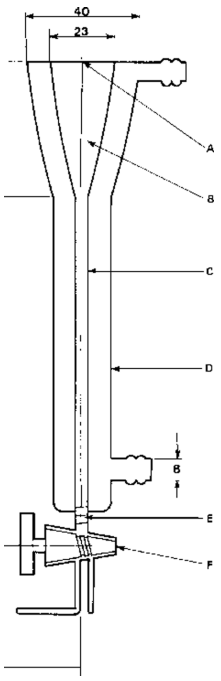
10. Η συσκευή που χρησιμοποιείται είναι μια μικροστήλη (σχήμα 1) η οποία διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία και είναι συνδεδεμένη με αντλία ανακυκλοφορίας (σχήμα 2) ή με δοχείο ισοστάθμισης (σχήμα 3). Η μικροστήλη περιέχει αδρανές υλικό στήριξης υπόστρωμα το οποίο συγκρατείται από ένα μικρό βύσμα από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

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

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

▼**M4**

Σχήμα 1



Διαστάσεις σε mm

A. Σύνδεση για γυάλινο σμυρισμένο σύνδεσμο

B. Υπερκείμενος χώρος

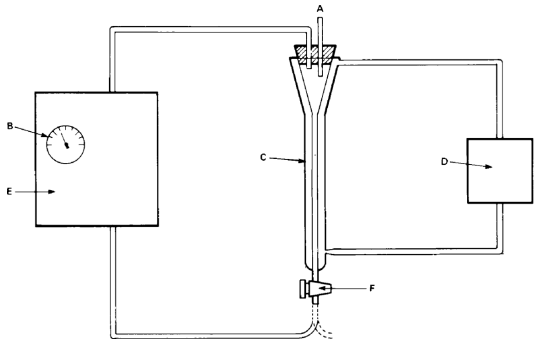
C. Εσωτερική διάμετρος 5

D. Εξωτερική διάμετρος 19

E. Βύσμα από υαλοβάμβακα

F. Στρόφιγγα

Σχήμα 2



A. Ατμοσφαιρική εξισορρόπηση

B. Ροόμετρο

C. Μικροστήλη

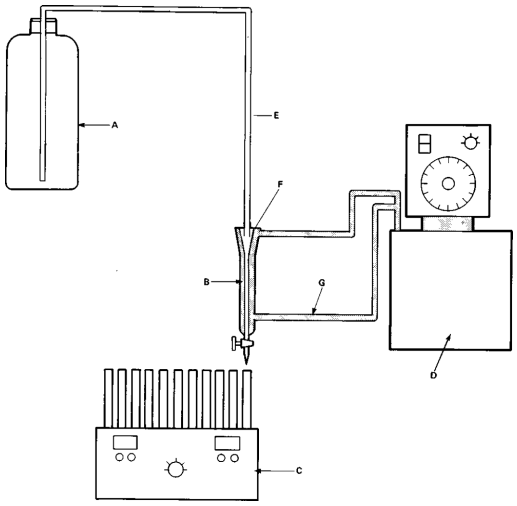
D. Θερμοστατούμενη αντλία κυκλοφορίας

E. Αντλία ανακυκλοφορίας

F. Αμφίδρομη βαλβίδα για δειγματοληψία

▼**M4**

Σχήμα 3



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

B. Στήλη

C. Συλλέκτης κλασμάτων

D. Θερμοστάτης

E. Σωλήνας από τεφλόν

F. Γυάλινος σμυρισμένος σύνδεσμος

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

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

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

Διαδικασία με τη χρήση αντλίας ανακυκλοφορίας

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

▼M4

Διαδικασία με τη χρήση δοχείου ισοστάθμισης

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

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

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

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

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

Μέθοδος της φιάλης

Αρχή

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

Συσκευές

22. Απαιτείται ο ακόλουθος εξοπλισμός:

— συνήθη εργαστηριακά γυάλινα σκεύη και όργανα,

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

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

— αναλυτικός εξοπλισμός.

Διαδικασία

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

▼M4

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

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

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

Αναλυτικοί προσδιορισμοί

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

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

Μέθοδος έκλουσης στήλης

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

Μέθοδος της φιάλης

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

Έκθεση δοκιμής

Μέθοδος έκλουσης στήλης

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

— τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής δοκιμής,

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

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

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

— τον μέσο όρο τουλάχιστον δύο διαδοχικών μετρήσεων,

— τη θερμοκρασία του νερού κατά τη διαδικασία κορεσμού,

— τη μέθοδο ανάλυσης,

— τη φύση του υλικού στήριξης,

— τη φόρτιση του υλικού στήριξης,

— τον χρησιμοποιηθέντα διαλύτη,

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

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

▼**M4**

Μέθοδος της φιάλης

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

— τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής δοκιμής,

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

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

— το pH κάθε δείγματος,

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

— τη θερμοκρασία δοκιμής,

— την αναλυτική μέθοδο,

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

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

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

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

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

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

▼B

Α.8. ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

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

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

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

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

▼B

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης

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

Μέθοδος HPLC

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

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

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

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1. **Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης**

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

1.4.2. **Μέθοδος HPLC**

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

▼B

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

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

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

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

1.5.1. **Επαναληψιμότητα**

Μέθοδοι ανακινούμενης φιάλης

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

Μέθοδος HPLC

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

1.5.2. **Ευαισθησία**

Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης

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

Μέθοδος HFLC

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

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

▼B

1.5.3. **Εξειδίκευση**

Μέθοδοι ανακινούμενης φιάλης

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

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

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

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής**

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

1.6.2. **Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης**

1.6.2.1. *Προπαρασκευή*

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

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

Σημείωση:

Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό λαμβανόμενο απευθείας από ιοντοανταλλάκτη.

1.6.2.1.1. Προκορεσμός των διαλυτών

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

▼B

1.6.2.1.2. Προετοιμασία για τη δοκιμή

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

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

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

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

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

1.6.2.1.3. Εξεταζόμενη ουσία

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

1.6.2.2. *Συνθήκες δοκιμής*

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

1.6.2.3. *Διαδικασία μέτρησης*

1.6.2.3.1. Αποκατάσταση της ισορροπίας κατανομής

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

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

1.6.2.3.2. Διαχωρισμός φάσεων

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

▼B

1.6.2.4. *Ανάλυση*

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

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

— φωτομετρικές μέθοδοι,

— αέρια χρωματογραφία,

— υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

1.6.3. **Μέθοδος HPLC**

1.6.3.1. *Προετοιμασία*

Συσκευή

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

Κινητή φάση

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

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

▼B

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

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

Διαλυόμενες ουσίες

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

Συνθήκες δοκιμής

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

1.6.3.2. **Μέτρηση**

Υπολογισμός του νεκρού χρόνου t_0

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

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

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

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

▼B

Καμπύλη αναφοράς

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

Προσδιορισμός τον παράγοντα χωρητικότητας της εξεταζόμενης ουσίας

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

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης

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

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

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

— επακριβείς προδιαγραφές της ουσίας (ταυτότητα και προσμείξεις),

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

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

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

— το αποτέλεσμα της προκαταρκτικής εκτίμησης, εφόσον υπάρχει,

— θερμοκρασία του προσδιορισμού,

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

— ο χρόνος και η ταχύτητα φυγοκέντρησης, εφόσον χρησιμοποιήθηκε,

▼B

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

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

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

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

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

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

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

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

Για τη μέθοδο HPLC:

— το αποτέλεσμα τυχόν προκαταρκτικής εκτίμησης,

— εξετασθείσες και ουσίες αναφοράς όπως και η καθαρότητα τους,

— περιοχή θερμοκρασιών στην οποία έγιναν οι προσδιορισμοί,

— pH στο οποίο έγιναν οι προσδιορισμοί,

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

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

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

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

— περιγραφή του εξοπλισμού και των λειτουργικών συνθηκών,

— περιγραφικά στοιχεία για την έκλουση,

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

— νεκρός χρόνος και πως μετρήθηκε.

▼B

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

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

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

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

▼B

Προσάρτημα 1

ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ/ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

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

— ως εργαστηριακός εσωτερικός έλεγχος για πιθανά πειραματικά σφάλματα,

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

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ

Προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής

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

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

ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

Αρχή των μεθόδων υπολογισμού

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

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

Ποιοτικά κριτήρια

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

▼B

Διαδικασίες υπολογισμού

Μέθοδος με το π του HANSCH

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

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

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

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

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

Μέθοδος Rekker

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

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

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

Μέθοδος Hansch-Leo

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

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

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

Συνδυασμένη μέθοδος

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

Παρατηρήσεις

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

▼B

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

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

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

Έκθεση

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

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

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

— περιγραφή της μεθόδου υπολογισμού,

— ταυτοποίηση ή παροχή βάσης δεδομένων,

— ιδιαιτερότητες στην επιλογή των τμημάτων,

— περιεκτική τεκμηρίωση του υπολογισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Προσάρτημα 2

Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς για τη μέθοδο HPLC

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

▼B

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

▼B

Α.9. ΣΗΜΕΙΟ ΑΝΑΦΛΕΞΗΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

Μονάδες: °C

$t = T - 273,15$

(t σε °C και T σε K)

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

1.5.1. **Επαναληψιμότητα**

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

1.5.2. **Ευαισθησία**

Η ευαισθησία εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο δοκιμής.

1.5.3. **Εξειδίκευση**

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

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προετοιμασίες**

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

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

1.6.2. **Συνθήκες δοκιμής**

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

1.6.3. **Εκτέλεση της δοκιμής**

1.6.3.1. *Μέθοδος ισορροπίας*

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

1.6.3.2. *Μέθοδος μη ισορροπίας*

Συσκευή ABEL:

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

Συσκευή Abel-Pensky:

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

Συσκευή Tag:

Βλέπε ASTM D 56.

Συσκευή Pensky-Martens:

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

Παρατηρήσεις:

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

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

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

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

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

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

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

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

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

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Ουδεμία.

▼B

Α.10. **ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ, ΣΤΕΡΕΑ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Χρόνος καύσης εκφραζόμενος σε δευτερόλεπτα.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑ

Δεν καθορίζονται.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Δεν δηλώνονται.

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προκαταρκτική δοκιμή ελέγχου**

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

1.6.2. **Δοκιμή ταχύτητας καύσης**

1.6.2.1. *Προετοιμασία*

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

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

1.6.2.2. *Συνθήκες δοκιμής*

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

1.6.2.3. *Εκτέλεση της δοκιμής*

Η στήλη της ουσίας φέρεται μέσα σε ένα απαγωγό.

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

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

▼B

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

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

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

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

— τις επακριβείς προδιαγραφές ουσίας (ταυτοποίηση και προσμείξεις),

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

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

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

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

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

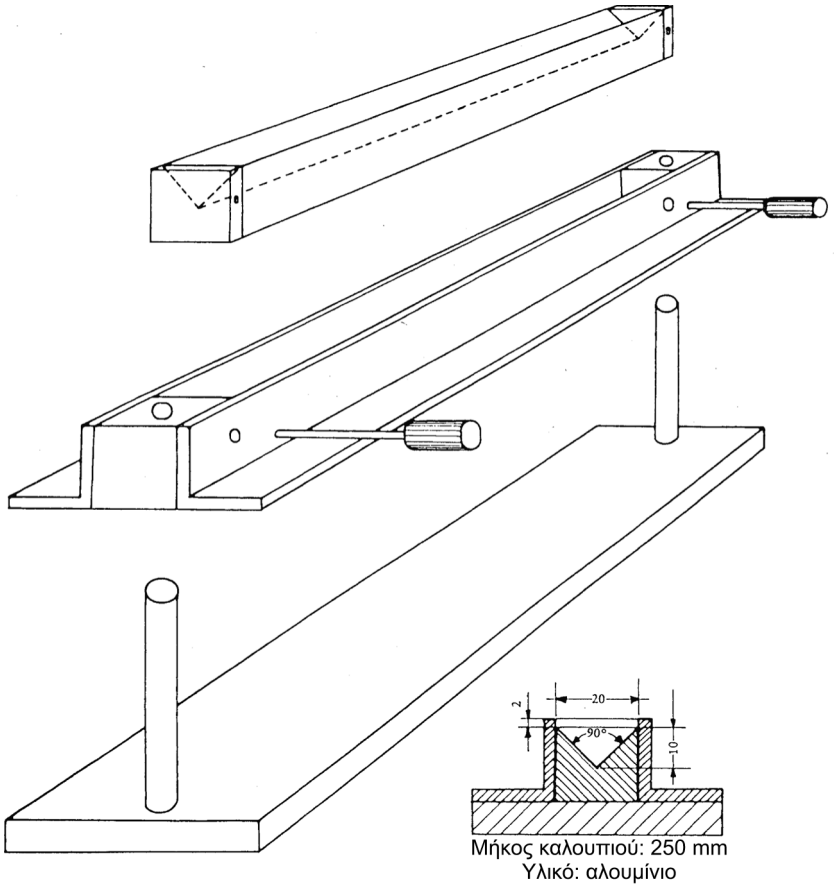
▼B

Προσάρτημα

Εικόνα

Καλούπι και εξαρτήματα για την παρασκευή της στήλης

(Όλες οι διαστάσεις σε mm)



▼B

A.11. **ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΑΕΡΙΑ)**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

1.3. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Δεν καθορίζεται.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Δεν δηλώνονται.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Συσκευή**

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

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

1.6.2. **Συνθήκες δοκιμής**

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

▼B

1.6.3. **Εκτέλεση της δοκιμής**

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

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

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

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

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

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

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

— μια περιγραφή, με διαστάσεις, της χρησιμοποιηθείσας συσκευής,

— τη θερμοκρασία στην οποία έγινε η δοκιμή,

— τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν και τα ληφθέντα αποτελέσματα,

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

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

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

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

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

▼B

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

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

1.3.1. **Στάδιο 1**

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

1.3.2. **Στάδιο 2**

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

1.3.3. **Στάδιο 3**

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

1.3.4. **Στάδιο 4**

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

▼B

1.4. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Δεν καθορίζεται.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Δεν δηλώνονται.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

1.6.1 **Στάδιο 1**

1.6.1.1. *Συνθήκες δοκιμής*

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

1.6.1.2. *Εκτέλεση της δοκιμής*

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

1.6.2. **Στάδιο 2**

1.6.2.1. *Συσκευή*

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

1.6.2.2. *Συνθήκες δοκιμής*

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

1.6.2.3. *Εκτέλεση της δοκιμής*

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

1.6.3. **Στάδιο 3**

1.6.3.1. *Συνθήκες δοκιμής*

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

1.6.3.2. *Εκτέλεση της δοκιμής*

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

▼B

1.6.4. **Στάδιο 4**

1.6.4.1. *Συσκευή*

Η συσκευή στήνεται όπως εικονίζεται στην εικόνα.

1.6.4.2. *Συνθήκες δοκιμής*

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

1.6.4.3. *Εκτέλεση της δοκιμής*

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

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

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Η ουσία θεωρείται σαν επικίνδυνη αν:

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

ή

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

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

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

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

— λεπτομέρειες για οποιαδήποτε αρχική προετοιμασία της εξεταζόμενης ουσίας,

▼B

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

— τη χημική ταυτότητα του εκλυόμενου αερίου,

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

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

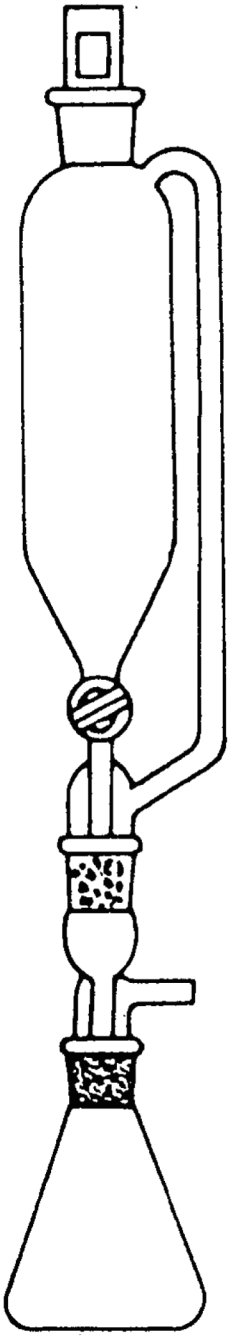
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products lor industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Προσάρτημα

Εικόνα

Συσκευή



▼B

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

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

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

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Δεν καθορίζονται.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

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

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1. **Συσκευή**

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

Σημείωση:

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

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

▼B

1.6.2. **Εκτέλεση της δοκιμής**

α) *Στερεά με μορφή σκόνης*

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

Η δοκιμή εκτελείται έξι φορές εκτός κι αν επέλθει ανάφλεξη.

β) *Υγρά*

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

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

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

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

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

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

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

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

— τα αποτελέσματα των δοκιμών,

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

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

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

▼B

Α.14. ΕΚΡΗΚΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία μέρη:

α) δοκιμή θερμικής ευαισθησίας (1)·

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

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

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

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Εκρηκτικές:

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

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

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

▼B

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

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

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

1.4.2. **Θερμική ευαισθησία**

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

1.4.3. **Μηχανική ευαισθησία (κρούση)**

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

1.4.4. **Μηχανική ευαισθησία (τριβή)**

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

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Δεν δηλώνονται.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

1.6.1.1. *Συσκευή*

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

▼B

1.6.1.2. *Συνθήκες δοκιμής*

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

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

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

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

1.6.1.3. *Εκτέλεση των δοκιμών*

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

▼B

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

1.6.1.4. *Αξιολόγηση*

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

1.6.2. **Μηχανική ευαισθησία (κρούση)**

1.6.2.1. *Συσκευή (εικόνα 4)*

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

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

1.6.2.2. *Συνθήκες δοκιμής*

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

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

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

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

▼B

1.6.2.3. *Εκτέλεση δοκιμών*

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

1.6.2.4. *Αξιολόγηση*

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

1.6.3. **Μηχανική ευαισθησία (τριβή)**

1.6.3.1. *Συσκευή (εικόνα 5)*

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

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

1.6.3.2. *Συνθήκες δοκιμής*

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

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

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

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

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

▼B

1.6.3.3. *Εκτέλεση των δοκιμών*

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

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

1.6.3.4. *Αξιολόγηση*

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

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

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

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

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

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

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

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

— αποτελέσματα κάθε τύπου δοκιμής,

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

▼B

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

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

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

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

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

▼B

Προσάρτημα

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

(1) Σωλήνας: Προδιαγραφή υλικού αριθ. 1.0336.505 g

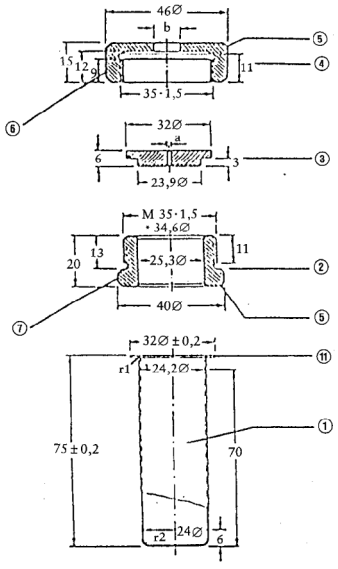
(2) Τρυπημένη πλάκα: Προδιαγραφή υλικού αριθ. 1.4873

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

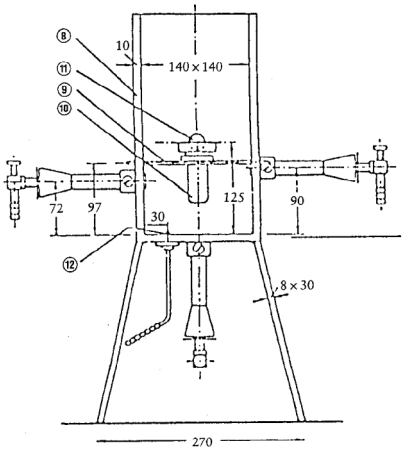
Εικόνα 1

Συσκευή δοκιμής θερμικής ευαισθησίας

(όλες οι διαστάσεις σε χιλιοστόμετρα)



Εικ. 1α Χαλύβδινος σωλήνας και εξαρτήματα



Εικ. 1β Προστατευτική καί θερμαντική διάταξη

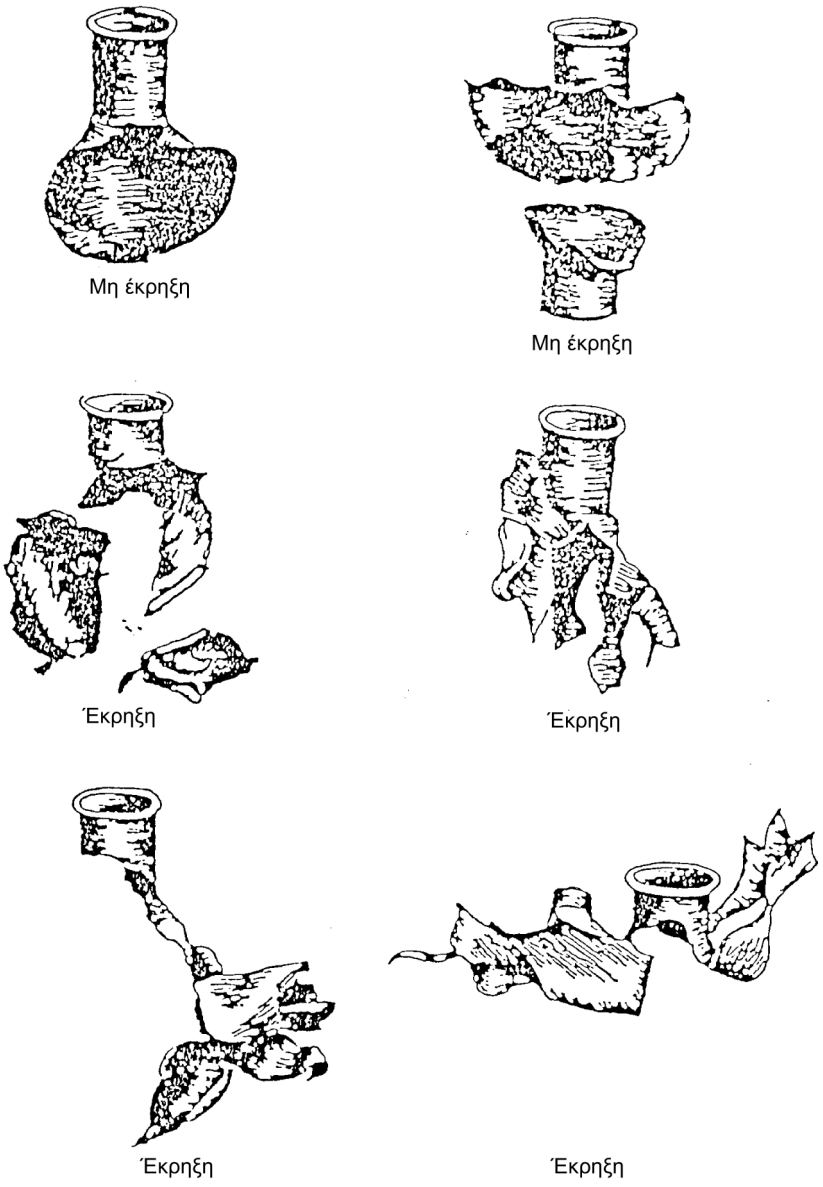
(1) σωλήνας
(1a) εξωτερική φλάντζα
(2) κοχλιοτομημένο κολλάρο σπείρωμα χαμηλής τριβής
(3) τρυπημένη πλάκα α = 2,0 ή 6 mm διάμετρος
(4) παξιμάδι β = 10 mm διάμετρος
(5) λοξοτομημένη επιφάνεια
(6) 2 παξιμάδια για κλειδί No 41
(7) 2 παξιμάδια για κλειδί No 36
(8) δοχείο αδιαπέρατο από θραύσματα
(9) 2 ράβδοι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

▼B

Εικόνα 2

Δοκιμή θερμικής ευαισθησίας

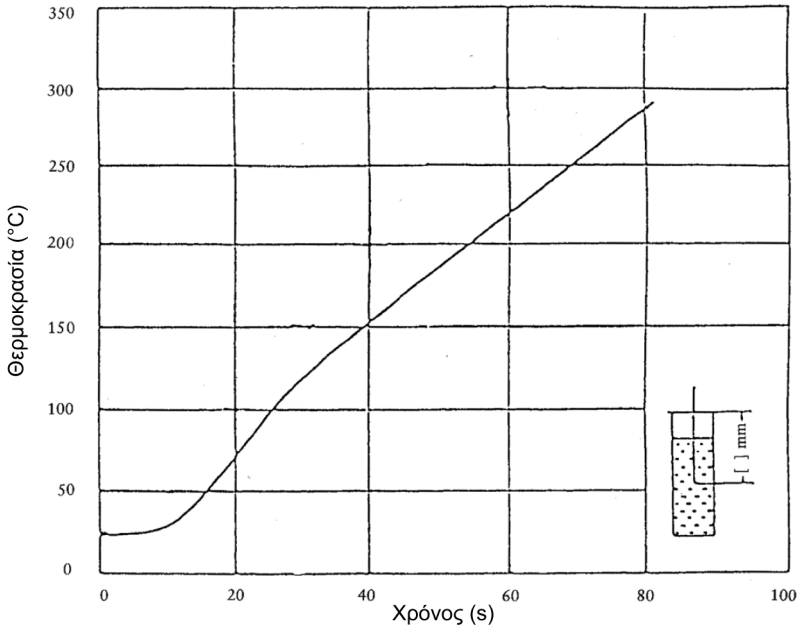
Παραδείγματα θραυσματοποίησης



▼B

Εικόνα 3

Βαθμονόμηση ταχύτητας θέρμανσης για τη δοκιμή θερμικής ευαισθησίας



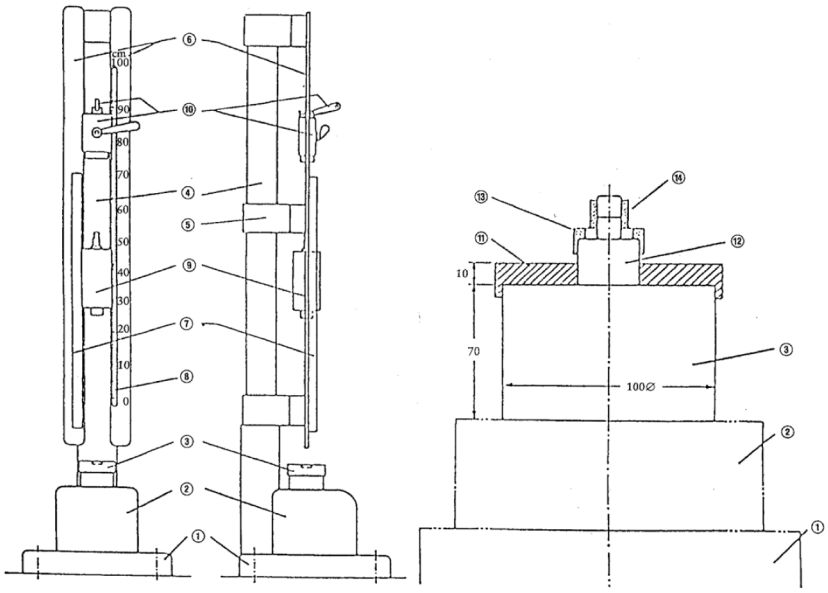
Καμπύλη θερμοκρασίας/χρόνου που λαμβάνεται θερμαίνοντας φθαλικό διβουτυλεστέρα (27 cm^3) σε κλειστό (τρυπητή πλάκα 1,5 mm) σωλήνα χρησιμοποιώντας προπάνιο με ταχύτητα ροής 3,2 λίτρα ανά λεπτό. Η θερμοκρασία μετριέται με ένα θερμοστοιχείο χρωμίου/αλουμινίου σε θήκη από ανοξείδωτο χάλυβα διαμέτρου 1 mm,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

▼B

Εικόνα 4

Συσκευή δοκιμής κρούσης

(όλες οι διαστάσεις σε χιλιοστόμετρα)



Εικ. 4α Συσκευή πίπτουσας σφύρας, εμπρόσθια και πλαγία όψη, γενική άποψη

(1) βάση, 450 x 450 x 60
(2) χαλύβδινος κορμός, 230 x 250 x 200
(3) αμόνι, 100 διάμετρος x 70
(4) στήλη
(5) μεσαίο εγκάρσιο στέλεχος
(6) 2 οδηγοί
(7) οδοντωτός κανόνας

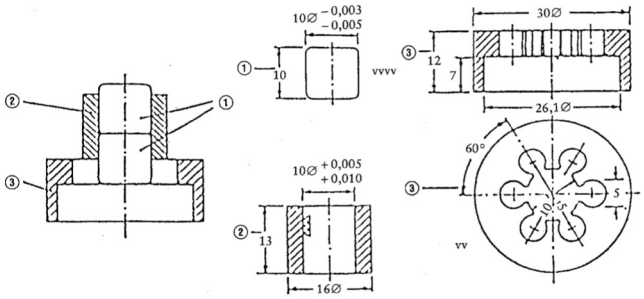
Εικ. 4β Πίπτουσα σφύρα, κάτω μέρος

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

▼B

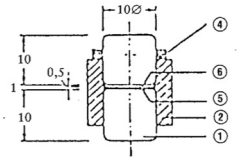
Εικόνα 4

(Συνέχεια)

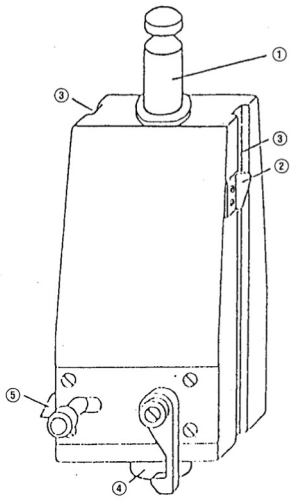


Εικ. 4γ Διάταξη κρούσης για ουσίες με μορφή σκόνης ή πάστας

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



Εικ. 4δ Διάταξη κρούσης για υγρές ουσίες



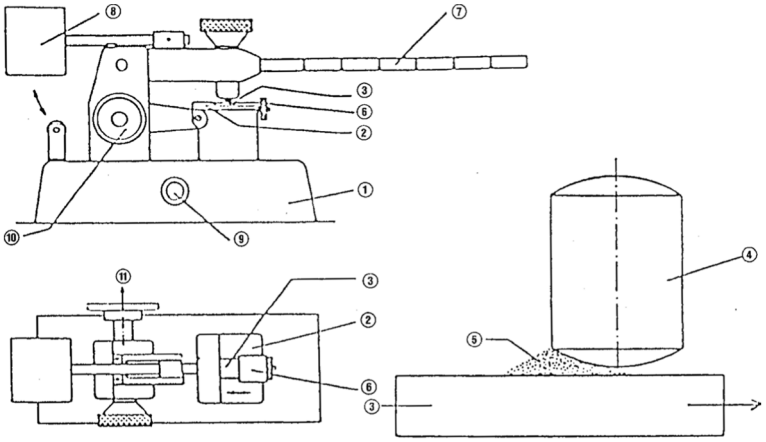
Εικ. 4ε Σφύρα (πίπτουσα μάζα 5 Kg)

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

▼B

Εικόνα 5

Συσκευή ευαισθησίας σε τριβή



Εικ. 5α Συσκευή τριβής Κάθετη και οριζόντια όψη

Εικ. 5β Αρχική θέση πασσάλου στο δείγμα

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

▼B

A.15. **ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΥΤΑΝΑΦΛΕΞΗΣ ΓΙΑ ΥΓΡΑ ΚΑΙ ΑΕΡΙΑ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

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

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

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Συσκευή**

Η συσκευή περιγράφεται στη μέθοδο που αναφέρεται στο σημείο 1.6.3.

1.6.2. **Συνθήκες δοκιμής**

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

1.6.3. **Εκτέλεση της δοκιμής**

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

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

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

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

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

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

— την ποσότητα του χρησιμοποιηθέντος δείγματος και την ατμοσφαιρική πίεση,

— τη χρησιμοποιηθείσα συσκευή,

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

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Ουδεμία.

▼B

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

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

1.3. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουδεμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Ουδέν.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Συσκευή**

1.6.1.1. *Φούρνος*

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

▼B

1.6.1.2. *Κύβος με συρμάτινο πλέγμα*

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

1.6.1.3. *Θερμοστοιχεία*

Κατάλληλα θερμοστοιχεία.

1.6.1.4. *Καταγραφέας*

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

1.6.2. **Συνθήκες δοκιμής**

Οι ουσίες εξετάζονται όπως παραλαμβάνονται.

1.6.3. **Εκτέλεση της δοκιμής**

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

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

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

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

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

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

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

— περιγραφή της προς εξέταση ουσίας,

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

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

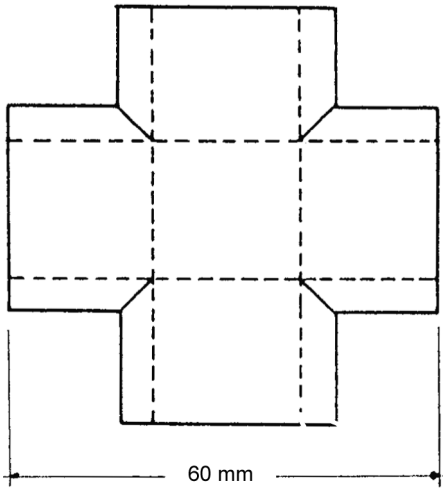
4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

▼B

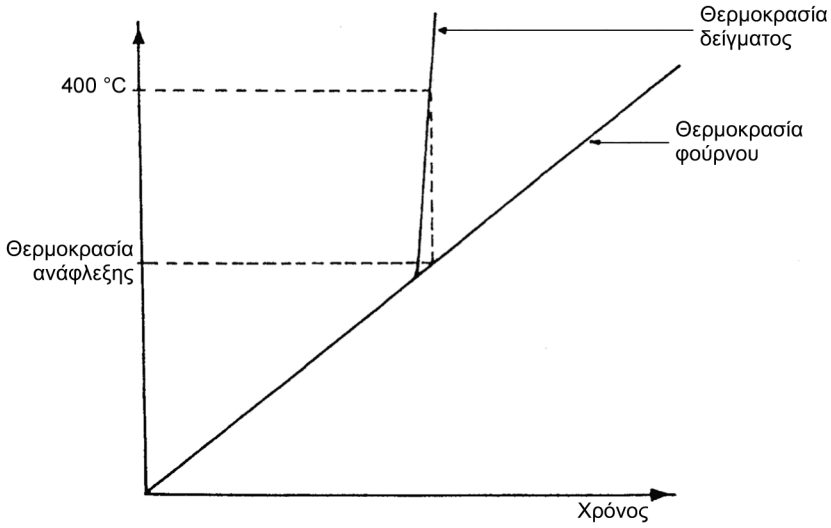
Εικόνα 1

Υπόδειγμα κύβου ελέγχου 20 mm



Εικόνα 2

Τυπική καμπύλη θερμοκρασίας/χρόνου



▼B

Α.17. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ (ΣΤΕΡΕΑ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

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

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

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

Ταχύτητα καύσης: εκφραζόμενη σε mm/s.

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

1.3. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

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

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

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

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

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

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προετοιμασία**

1.6.1.1. *Εξεταζόμενη ουσία*

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

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

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

1.6.1.2. *Καύσιμη ουσία*

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

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

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

1.6.1.3. *Πηγή έναυσης*

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

1.6.2. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Σημείωση:

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

1.6.2.1. *Προκαταρκτική δοκιμή*

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

▼B

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

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

Η ουσία θεωρείται οξειδωτική αν η αντίδραση είναι ισχυρή.

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

1.6.2.2. *Διαδικασία δοκιμής*

Παρασκευάζονται μείγματα οξειδωτικού—κυτταρίνης που περιέχουν από 10 έως 90 % οξειδωτικό με διαδοχικές αυξήσεις 10 %. Σε οριακές περιπτώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και ενδιάμεσα μείγματα οξειδωτικού/κυτταρίνης προκειμένου να μετρηθεί ακριβέστερα η μέγιστη ταχύτητα καύσης.

Ο σωρός μορφοποιείται με τη βοήθεια καλουπιού. Το καλούπι είναι κατασκευασμένο από μέταλλο, έχει μήκος 250 mm και τριγωνική διατομή με εσωτερικό ύψος 10 mm και εσωτερικό πλάτος 20 mm. Στις δύο πλευρές του καλουπιού, κατά τη διαμήκη διεύθυνση, τοποθετούνται σαν πλευρικές περιοριστικές επιφάνειες δύο μεταλλικές πλάκες που προεξέχουν 2 mm από την πάνω ακμή της τριγωνικής διατομής (εικόνα). Η κατασκευή αυτή γεμίζεται χωρίς αυτό να «πατηθεί» με ελαφρά περίσσεια μείγματος. Αφού το καλούπι αφεθεί να πέσει μία φορά από ύψος 2 cm σε μία στερεή επιφάνεια, η παραμένουσα περίσσεια ουσίας απομακρύνεται με ξύσιμο με ένα φύλλο που μετακινείται λοξά. Οι πλευρικές περιοριστικές επιφάνειες απομακρύνονται και η παραμένουσα σκόνη λειαίνεται με τη βοήθεια κυλίνδρου. Στο πάνω μέρος του καλουπιού τοποθετείται τότε μία άκαυστη, χωρίς πόρους και χαμηλής θερμοαγωγιμότητας πλάκα, η συσκευή ανατρέπεται και το καλούπι απομακρύνεται.

Ο σωρός τοποθετείται στο ρεύμα απαγωγού εστίας.

Η ταχύτητα του αέρα πρέπει να είναι αρκετή ώστε οι καπνοί να εμποδίζονται να διαφεύγουν στο εργαστήριο και δεν θα πρέπει να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Γύρω από τη συσκευή θα πρέπει να τοποθετείται ένας ανεμοθώρακας.

Εξαιτίας της υγροσκοπικότητας της κυτταρίνης και ορισμένων εξεταζομένων ουσιών, η δοκιμή θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν γρηγορότερα.

Η μία άκρη του σωρού αναφλέγεται ακουμπώντας εκεί τη φλόγα.

Μετριέται ο χρόνος της αντίδρασης για μία απόσταση 200 mm, αφού η ζώνη αντίδρασης έχει μετακινηθεί σε μία αρχική απόσταση 30 mm.

Η δοκιμή εκτελείται με την ουσία αναφοράς και μία τουλάχιστον φορά με καθεμία από τη σειρά των μειγμάτων της εξεταζόμενης ουσίας με την κυτταρίνη.

Αν η μέγιστη ταχύτητα καύσης βρεθεί να είναι σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη του μείγματος αναφοράς, η δοκιμή μπορεί να διακοπεί' διαφορετικά, η δοκιμή θα πρέπει να επαναληφθεί πέντε φορές για καθένα από τα τρία μείγματα που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ταχύτητα καύσης.

▼B

Αν υπάρχει η υποψία ότι το αποτέλεσμα είναι εσφαλμένα θετικό, τότε η δοκιμή θα πρέπει να επαναληφθεί χρησιμοποιώντας μία αδρανή ουσία με παρόμοιο μέγεθος σωματιδίων, όπως π.χ. kieselguhr, αντί της κυτταρίνης. Εναλλακτικά, το μείγμα εξεταζόμενης ουσίας/κυτταρίνης με τη μεγαλύτερη ταχύτητα καύσης, θα πρέπει να ξαναϋποβληθεί σε δοκιμή σε αδρανή ατμόσφαιρα (< 2 % v/v περιεκτικότητα σε οξυγόνο).

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Για λόγους ασφάλειας η μέγιστη ταχύτητα καύσης —όχι η μέση τιμή— θα πρέπει να θεωρείται ως χαρακτηριστική οξειδωτική ιδιότητα της εξεταζόμενης ουσίας.

Για αξιολόγηση λαμβάνεται η μεγαλύτερη τιμή ταχύτητας καύσης από μία σειρά έξι δοκιμών ενός δεδομένου μείγματος.

Χαράσσεται καμπύλη της μέγιστης τιμής ταχύτητας καύσης για κάθε μείγμα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του οξειδωτικού. Από την καμπύλη λαμβάνεται η μέγιστη ταχύτητα καύσης.

Οι έξι τιμές ταχύτητας καύσης που λαμβάνονται από μία σειρά μετρήσεων του μείγματος με τη μέγιστη ταχύτητα καύσης, δεν πρέπει να διαφέρουν από τη μέση αριθμητική τιμή περισσότερο από 10 % διαφορετικά, πρέπει οι μέθοδοι άλεσης και ανάμειξης να βελτιωθούν.

Συγκρίνεται η λαμβανομένη μέγιστη ταχύτητα καύσης με τη μέγιστη ταχύτητα καύσης του μίγματος αναφοράς (βλέπε σημείο 1.3).

Αν οι δοκιμές διεξαχθούν σε αδρανή ατμόσφαιρα, η μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης συγκρίνεται με την αντίστοιχη του μείγματος αναφοράς σε αδρανή ατμόσφαιρα.

3. **ΕΚΘΕΣΗ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

— την ταυτότητα, σύνθεση, καθαρότητα, υγρασία, κ.λπ., της εξεταζόμενης ουσίας,

— κάθε επεξεργασία του δείγματος δοκιμής (π.χ. άλεση, ξήρανση, κ.λπ.),

— την πηγή έναυσης που χρησιμοποιείται στις δοκιμές,

— τα αποτελέσματα των μετρήσεων,

— τον τρόπο αντίδρασης (π.χ. επιφανειακή καύση, καύση σε όλη τη μάζα, κάθε πληροφορία σχετικά με τα προϊόντα καύσης, κ.λπ.),

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανόμενης και μιας περιγραφής της ισχύος (καύση με φλόγα, με σπινθήρες, με καπνό, σιγανή καύση, κ.λπ.) και η κατά προσέγγιση διάρκεια στην προκαταρκτική δοκιμή ασφάλειας/διερεύνησης και τόσο για την εξεταζόμενη ουσία όσο και για την ουσία αναφοράς,

— τα αποτελέσματα από δοκιμές με αδρανή ουσία, αν υπάρχουν,

— τα αποτελέσματα από δοκιμές σε αδρανή ατμόσφαιρα, αν υπάρχουν.

▼B

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Μία ουσία πρέπει να θεωρείται ως οξειδωτική ουσία όταν:

α) στην προκαταρκτική δοκιμή, εμφανίζεται ισχυρή αντίδραση·

β) στη ολοκληρωμένη δοκιμή, η μέγιστη ταχύτητα καύσης των εξεταζόμενων μειγμάτων, είναι μεγαλύτερη ή ίση με τη μέγιστη ταχύτητα καύσης του μείγματος αναφοράς κυτταρίνης και νιτρικού βαρίου.

Για να αποφευχθεί η συναγωγή εσφαλμένου θετικού αποτελέσματος, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται όταν εξετάζεται η ουσία αναμεμειγμένη με ένα αδρανές υλικό ή/και όταν εξετάζεται σε κάποια αδρανή ατμόσφαιρα θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη όταν ερμηνεύονται τα αποτελέσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

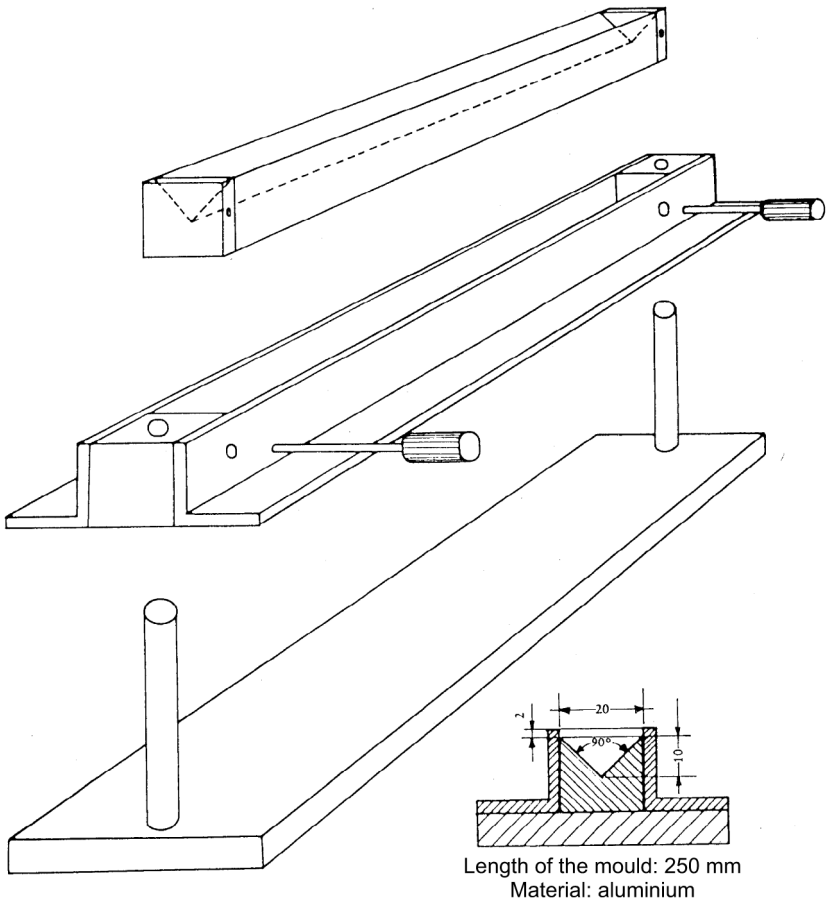
▼B

Προσάρτημα

Εικόνα

Καλούπι και εξαρτήματα για την ετοιμασία της στήλης

(Όλες οι διαστάσεις εκφράζονται σε mm)



▼B

Α.18. ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΟ — ΜΕΣΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η χρωματογραφική αυτή μέθοδος διείσδυσης πηκτής αποτελεί αντιγραφή της OECD TGG 118 (1996). Οι βασικές αρχές και άλλες τεχνικές πληροφορίες παρέχονται στην παραπομπή 1.

1.1. Εισαγωγή

Επειδή οι ιδιότητες των πολυμερών διαφέρουν πάρα πολύ, είναι αδύνατον να περιγραφεί μία μοναδική μέθοδος στην οποία να καθορίζονται επακριβώς οι συνθήκες για τον διαχωρισμό και την αξιολόγηση που να καλύπτουν όλες τις πιθανότητες και ειδικές περιπτώσεις που συναντώνται στο διαχωρισμό πολυμερών. Συχνά μάλιστα, σε ορισμένα πολύπλοκα πολυμερών συστήματα, δεν μπορεί να εφαρμοστεί η χρωματογραφία διείσδυσης πηκτής (GPC). Όταν η GPC είναι πρακτικά ανεφάρμοστη, το μοριακό βάρος μπορεί να προσδιοριστεί με άλλες μεθόδους (βλέπε παράρτημα). Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να δίδονται πλήρεις λεπτομέρειες και αιτιολόγηση για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο.

Η περιγραφόμενη μέθοδος βασίζεται στο πρότυπο DIN 55672 (1). Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την εκτέλεση των πειραμάτων και την αξιολόγηση των δεδομένων μπορούν να αναζητηθούν σε αυτό το πρότυπο DIN. Στην περίπτωση που χρειάζονται τροποποιήσεις των πειραματικών συνθηκών, οι αλλαγές αυτές πρέπει να αιτιολογούνται. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα πρότυπα, εφόσον όμως γίνεται πλήρης αναφορά σε αυτά. Στην περιγραφόμενη μέθοδο χρησιμοποιούνται δείγματα πολυστυρολίου γνωστής πολυδιασπαρσιμότητας για διακρίβωση ενώ μπορεί να χρειάζεται να τροποποιηθούν για να είναι κατάλληλα για ορισμένα πολυμερή, π.χ. υδατοδιαλυτά και διακλαδισμένα με μακριές αλυσίδες πολυμερή.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Το αριθμητικό μέσο μοριακό βάρος M_n και το σταθμικό μέσο μοριακό βάρος M προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

όπου:

H_i είναι το επίπεδο του σήματος του ανιχνευτή από τη βασική γραμμή για τον όγκο κατακράτησης V_i,

M_i είναι το μοριακό βάρος του κλάσματος του πολυμερούς στον όγκο κατακράτησης V_i και

n είναι ο αριθμός των σημείων δεδομένων.

Το εύρος της κατανομής των μοριακών βαρών, το οποίο αποτελεί μέτρο της διασπαρσιμότητας του συστήματος, δίδεται από το λόγο M_w/M_n.

▼B

1.3. Ουσίες αναφοράς

Επειδή η GPC είναι μία σχετική μέθοδος, πρέπει να γίνεται διακρίβωση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται συνήθως πρότυπα πολυστυρολίου, κατανεμημένα σε μία στενή περιοχή με γραμμική διαμόρφωση. με γνωστά μέσα μοριακά βάρη M_η και M_w και γνωστή κατανομή μοριακών βαρών. Η καμπύλη διακρίβωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του άγνωστου δείγματος μόνον εάν οι συνθήκες για το διαχωρισμό του δείγματος και τα πρότυπα έχουν επιλεγεί με ταυτόσημο τρόπο.

Κάθε προσδιοριζόμενη σχέση μεταξύ του μοριακού βάρους και του όγκου εκλούσεως είναι έγκυρη μόνον υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος. Στις συνθήκες περιλαμβάνονται, κυρίως η θερμοκρασία, ο διαλύτης (ή μείγμα διαλυτών), οι χρωματογραφικές συνθήκες και *τ* στήλη ή το σύστημα στηλών διαχωρισμού.

Τα μοριακά βάρη του δείγματος που προσδιορίζονται με τον τρόπο αυτό είναι σχετικέ; τιμές και χαρακτηρίζονται ως «ισοδύναμα μοριακά βάρη πολυστυρολίου». Αυτό σημαίνει ότι ανάλογα με τις δομικές και χημικές διαφορές μεταξύ του δείγματος και των προτύπων, τα μοριακά βάρη μπορούν να αποκλίνουν από τις απόλυτες τιμές κατά ένα μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα πρότυπα, π.χ. πολυαιθυλενογλυκόλη, πολυαιθυλενοξείδιο, μεθακρυλικός πολυμεθυλεστέρας. πολυακρυλικό οξύ, θα πρέπει να δηλώνεται ο λόγος.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Και η κατανομή των μοριακών βαρών του δείγματος και τα μέσα μοριακά βάρη (M_w και M_η μπορούν να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας GPC. Η GPC είναι ένας ειδικός τύπος υγρής χρωματογραφίας στην οποία το δείγμα διαχωρίζεται ανάλογα με τους υδροδυναμικούς όγκους των επιμέρους συστατικών (2).

Ο διαχωρισμός επιτελείται καθώς το δείγμα διέρχεται από στήλη γεμισμένη με πορώδες υλικό, συνήθως μία οργανική πηκτή. Τα μικρά μόρια μπορούν να διεισδύουν στους πόρους ενώ τα μεγάλα μόρια αδυνατούν. Έτσι η διαδρομή των μεγάλων μορίων είναι μικρότερη και εκλούονται πρώτα. Τα μεσαίου μεγέθους μόρια διεισδύουν κάπως στους πόρους και εκλούονται αργότερα. Τα μικρότερα μόρια, με μέση υδροδυναμική ακτίνα μικρότερη από τους πόρους της πηκτής μπορούν να διεισδύουν σε όλους τους πόρους. Αυτά εκλούονται τελευταία.

Θεωρητικά, ο διαχωρισμός εξαρτάται αποκλειστικά από το μέγεθος των μορίων, στην πράξη όμως είναι δύσκολο να αποφευχθεί η παρεμβολή, τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό, ορισμένων φαινομένων προσρόφησης. Η κατάσταση μπορεί να χειροτερεύσει από τυχόν μη ομοιόμορφη πλήρωση της στήλης και ύπαρξη κενών όγκων (2).

Η ανίχνευση πραγματοποιείται με τη βοήθεια π.χ. του δείκτη διάθλασης ή της απορρόφησης στο LJV, λαμβάνεται δε μία καμπύλη απλής κατανομής. Εντούτοις, για να παρέχει η καμπύλη πραγματικές τιμές μοριακών βαρών, είναι αναγκαίο η στήλη να διακριβώνεται διοχετεύοντας μέσα από αυτή πολυμερή γνωστού μοριακού βάρους και. στην ιδανική περίπτωση, παρόμοιας όσο το δυνατόν δομής π.χ. διάφορα πρότυπα πολυστυρολίου Συνήθως λαμβάνεται μία καμπύλη Gauss, παραμορφωμένη μερικές φορές από μία μικρή ουρά προς την πλευρά των χαμηλών μοριακών βαρών. Ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την κατά βάρος ποσότητα των με διάφορα βάρη εκλουόμενων κλασμάτων ενώ ο οριζόντιος άξονας δείχνει το λογαριθμικό μοριακό βάρος.

▼B

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Η επαναληψιμότητα (σχετική τυπική απόκλιση: ΣΤΑ) του όγκου έκλουσης θα πρέπει να είναι καλύτερη του 0,3 %. Εάν ένα χρωματογράφημα αξιολογείται σε εξάρτηση από το χρόνο και δεν πληροί το ανωτέρω αναφερθέν κριτήριο (1), η απαιτούμενη για την ανάλυση επαναληψιμότητα πρέπει να διασφαλίζεται διορθώνοντας την με ένα εσωτερικό πρότυπο. Οι πολυδιασπαρσιμότητες εξαρτώνται από τα μοριακά βάρη των προτύπων. Στην περίπτωση των προτύπων πολυστυρολίου οι συνήθεις τιμές είναι:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 < M_p < 10^{'}$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p είναι το μοριακό βάρος του προτύπου στο ανώτατο σημείο της κορυφής).

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής

1.6.1. **Παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων πολυστυρολίου**

Τα πρότυπα πολυστυρολίου διαλύονται με επισταμένη ανάμειξη στο επιλεγμένο εκλουστικό μέσον. Κατά την παρασκευή των διαλυμάτων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι συγκεντρώσεις των επιλεγόμενων προτύπων εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, π.χ. από τον όγκο έγχυσης, το ιξώδες του διαλύματος και την ευαισθησία του αναλυτικού ανιχνευτή. Ο μέγιστος όγκος έγχυσης πρέπει να προσαρμόζεται στο μήκος της στήλης για να αποφεύγεται τυχόν υπερφόρτιση. Οι συνήθεις όγκοι έγχυσης για αναλυτικούς διαχωρισμούς με GPC και στήλη 30 cm × 7,8 mm, είναι κανονικά μεταξύ 40 και 100 μl. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και μεγαλύτεροι όγκοι, αυτοί όμως δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 250 μl. Πριν από τη διακρίβωση της στήλης πρέπει να προσδιορίζεται ποια είναι η άριστη σχέση μεταξύ του όγκου έγχυση; και της συγκεντρώσεως.

1.6.2. **Παρασκευή του διαλύματος του δείγματος**

Για την παρασκευή των διαλυμάτων του δείγματος ισχύουν κατ' αρχήν οι ίδιες απαιτήσεις. Το δείγμα διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη, π.χ. τετραϋδροφουράνιο (THF), με προσεκτική ανακίνηση. Σε καμία περίπτωση δεν θα πρέπει να διαλύεται με χρήση λουτρού υπερήχων. Εφόσον απαιτείται, το διάλυμα του δείγματος καθαρίζεται μέσω φίλτρου μεμβράνης με μέγεθος πόρων μεταξύ 0,2 και 2 μm.

Εάν υπάρχουν αδιάλυτα σωματίδια, αυτό πρέπει να αναγράφεται στην τελική έκθεση γιατί αυτά μπορεί να οφείλονται σε κλάσματα υψηλού μοριακού βάρους. Για τον προσδιορισμό του κατά βάρος ποσοστού των αδιάλυτων σωματιδίων θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία κατάλληλη μέθοδος. Τα διαλύματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μέσα σε 24 ώρες.

1.6.3. **Συσκευές**

— δοχείο διαλύτη

— απαεριωτής (όπου χρειάζεται)

— αντλία

▼B

— αποσβεστήρας παλμών (όπου χρειάζεται)

— σύστημα εγχύσεως

— στήλες χρωματογραφίας

— ανιχνευτής

— ροόμετρο (όπου χρειάζεται)

— καταγραφέας-επεξεργαστής δεδομένων

— δοχείο αποβλήτων.

Πρέπει να διασφαλίζεται ότι το σύστημα GPC είναι αδρανές έναντι των χρησιμοποιουμένων διαλυτών (π.χ. χρησιμοποιώντας χαλύβδινα τριχοειδή για το διαλύτη THF).

1.6.4. **Έγχυση και σύστημα παροχής διαλύτη**

Ορισμένος όγκος του διαλύματος του δείγματος φέρεται στη στήλη χρησιμοποιώντας είτε αυτόματο δειγματολήπτη είτε με τα χέρια σε μία επακριβώς καθορισμένη ζώνη. Εάν η εργασία γίνεται με τα χέρια. πρέπει να αποφεύγεται κάθε απότομο τράβηγμα ή πίεση του εμβόλου της σύριγγας γιατί κάτι τέτοιο μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στη μετρούμενη κατανομή μοριακών βαρών. Τα σύστημα παροχής του διαλύτη θα πρέπει, όσο το δυνατόν, να μην επηρεάζεται θεωρητικά από παλμούς με τη βοήθεια ενός αποσβεστήρα παλμών. Η ταχύτητα ροής είναι της τάξης του 1 ml/mi n.

1.6.5. **Στήλη**

Η αναγνώριση του πολυμερούς γίνεται, ανάλογα με το δείγμα, είτε με μία απλή στήλη είτε με περισσότερες από μία στήλες συνδεδεμένες διαδοχικά. Στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά πορώδη για στήλες υλικά με καθορισμένες ιδιότητες (π.χ. μέγεθος πόρων, όρια αποκλεισμού). Η επιλογή της πηκτής διαχωρισμού ή του μήκους της στήλης εξαρτάται τόσον από τις ιδιότητες του δείγματος (υδροδυναμικός όγκος, κατανομή μοριακών βαρών) όσο και από τις ειδικές συνθήκες για το διαχωρισμό όπως ο διαλύτης, η

1.6.6. **Θεωρητικές πλάκες**

Η στήλη ή ο συνδυασμός των στηλών που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πρέπει να χαρακτηρίζονται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Αυτό σημαίνει ότι στην περίπτωση όπου ως διαλύτης εκλούσεως χρησιμοποιείται THF, θα πρέπει να γίνεται φόρτιση στήλης γνωστού μήκους με διάλυμα αιθυλοβενζολίου ή άλλου κατάλληλου μη πολικού διαλυμένου σώματος. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών δίδεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{ή} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

όπου;

N είναι ο αριθμός *των* θεωρητικών πλακών

V_e είναι ο όγκος εκλούσεως στο ανώτατο σημείο της κορυφής

▼B

W είναι το πλάτος της γραμμής βάσεως της κορυφής

$W_{1/2}$ είναι το πλάτος της κορυφής στο ήμισυ του ύψους της.

1.6.7. **Ικανότητα διαχωρισμού**

Εκτός από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών, που είναι ένα μέγεθος που προσδιορίζει το εύρος της ζώνης, ένα μέρος εξαρτάται και από την ικανότητα διαχωρισμού, μέγεθος που προσδιορίζεται από το βαθμό κλίσεως της καμπύλης διακριβώσεως. Η ικανότητα διαχωρισμού μίας στήλης βρίσκεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{εμβαδόν εγκάρσιας διατομής στήλης}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

όπου,

V_{eMx} είναι ο όγκος εκλούσεως για πολυστυρόλιο με μοριακό βάρος M_X

$V_{e(10M_X)}$ είναι ο όγκος εκλούσεως νια πολυστυρόλιο με δεκαπλάσιο μοριακό βάρος.

Η αναλυτική ικανότητα του συστήματος ορίζεται συνήθως ως εξής:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

όπου:

V_{e1}, V_{e2} είναι οι όγκοι εκλούσεως των δύο προτύπων πολυστυρολίου στο μέγιστο της κορυφής,

W_1 , W_2 είναι τα πλάτη της κορυφής στη γραμμή βάσεως

M_1, M_2 είναι τα μοριακά βάρη στο μέγιστο της κορυφής (που πρέπει να διαφέρουν κατά ένα συντελεστή 10).

Η τιμή R για το σύστημα στηλών θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 1,7 (4).

1.6.8 **Διαλύτες**

Όλοι οι διαλύτες πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (για το THF απαιτείται καθαρότητα 99,5 %). Το δοχείο του διαλύτη (το οποίο, εφόσον χρειάζεται, πρέπει να είναι σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου) πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο για τη διακρίβωση της στήλης και την ανάλυση αρκετών δειγμάτων Ο διαλύτης πρέπει να απαεριώνεται πριν μεταφερθεί στη στήλη μέσω της αντλίας.

1.6.9. **Έλεγχος θερμοκρασίας**

Η θερμοκρασία των κρίσιμων εσωτερικών εξαρτημάτων (βρόχος εγχύσεως, στήλες, ανιχνευτής και σωληνώσεις) θα πρέπει να είναι σταθερή και κατάλληλη για τον επιλεγέντα διαλύτη.

▼B

1.6.10. **Ανιχνευτής**

Σκοπός του ανιχνευτή είναι να καταγράφει ποσοτικώς τη συγκέντρωση του δείγματος που εκλούζεται από τη στήλη. Για να αποφεύγεται άσκοπη διεύρυνση των κορυφών, ο όγκος της κυψελίδας του ανιχνευτή πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος. Η τιμή του όγκου δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 10 ml εκτός από την περίπτωση ανιχνευτών διάχυσης του φωτός και ιξώδους. Για την ανίχνευση χρησιμοποιείται συνήθως διαφορική διαθλασιμετρία. Εντούτοις, εφόσον το επιβάλλουν οι συγκεκριμένες ιδιότητες του δείγματος ή του διαλύτη εκλούσεως. μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι τύποι ανιχνευτών, π.χ. UV/VIS-, IR-, ανιχνευτές ιξώδους κ.λπ.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

2.1. Δεδομένα

Για τα λεπτομερή κριτήρια αξιολόγησης καθώς επίσης και τις απαιτήσεις που σχετίζονται με τη συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων, θα πρέπει να γίνεται αναφορά στο πρότυπο DIN (1).

Για κάθε δείγμα πρέπει να πραγματοποιούνται δύο ανεξάρτητα πειράματα και να γίνονται επιμέρους αναλύσεις.

Σε κάθε μέτρηση πρέπει να παρέχονται τα M_n, M_w, M_u/M_h και M_p και να αναφέρεται ρητώς, ότι οι μετρούμενες τιμές είναι σχετικές τιμές ισοδύναμε; με τα μοριακά βάρη του χρησιμοποιούμενου προτύπου.

Μετά τον προσδιορισμό των όγκων κατακράτησης ή των χρόνων κατακράτησης (διορθωμένων πιθανόν με βάση ένα εσωτερικό πρότυπο), κατασκευάζεται γραφική παράσταση των τιμών log M (M είναι τα ανώτατα σημεία των κορυφών των προτύπων διακριβώσεως) συναρτήσει μίας από τις ποσότητες αυτές. Για κάθε δεκάδα μοριακών βαρών απαιτούνται τουλάχιστον δύο σημεία διακρίβωσης ενώ. για τη συνολική καμπύλη, απαιτούνται τουλάχιστον πέντε σημεία μετρήσεως, σημεία που θα πρέπει να καλύπτουν το εκτιμώμενο μοριακό βάρος του δείγματος. Το προς τα χαμηλά μοριακά βάρη ακραίο σημείο της καμπύλης διακριβώσεως ορίζεται από η-εξυλοβενζόλιο ή άλλη κατάλληλη μη πολική διαλυμένη ουσία. Το αριθμητικό μέσο και το σταθμικό μέσο μοριακό βάρος προσδιορίζονται εν γένει μέσω επεξεργασίας ηλεκτρονικών δεδομένων, με βάση τους τύπους του σημείου 1.2. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται διά χειρός ψηφιοποίηση, μπορεί κανείς να κάνει χρήση του ASTM D 3536-91 (3).

Η καμπύλη κατανομής πρέπει να παρέχεται με τη μορφή πίνακα ή εικόνας (διαφορική συχνότητα ή αθροιστικά ποσοστά συναρτήσει του log M). Στη γραφική παράσταση, μία δεκάδα μοριακών βαρών θα πρέπει κανονικά να αντιστοιχεί σε πλάτος περίπου 4 cm ενώ το μέγιστο της κορυφής θα πρέπει να είναι σε ύψος περίπου 8 cm. Στην περίπτωση ολοκληρωμένων καμπυλών κατανομής η διαφορά στην τεταγμένη μεταξύ 0 και 100 % θα πρέπει να είναι περίπου 10 cm.

2.2. Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1. **Υπό δοκιμή ουσία**

— υπάρχουν στοιχεία για την υπό δοκιμή ουσία (ταυτότητα, πρόσθετα, προσμείξεις),

▼B

— περιγραφή της κατεργασίας του δείγματος, παρατηρήσεις, προβλήματα.

2.2.2. **Εξοπλισμός**

— περιέκτης εκλουστικού μέσου, αδρανές αέριο, απαερίωση του εκλουστικού μέσου, σύσταση του εκλουστικού μέσου, προσμείξεις,

— αντλία, αποσβεστήρας παλμών, σύστημα εγχύσεως,

— στήλες διαχωρισμού (κατασκευαστής, όλα τα σχετικά με τα χαρακτηριστικά των στηλών όπως μέγεθος πόρων, είδος υλικού διαχωρισμού κ.λπ., αριθμός, μήκος και σειρά των χρησιμοποιηθεισών στηλών),

— αριθμός των θεωρητικών πλακών της στήλης (ή συνδυασμού), ικανότητα διαχωρισμού (αναλυτική ικανότητα του συστήματος),

— πληροφορίες για τη συμμετρία των κορυφών,

— θερμοκρασία στηλών, τρόπος ελέγχου της θερμοκρασίας,

— ανιχνευτής (αρχή μετρήσεως, τύπος, όγκος κυψελίδας),

— ρυόμετρο, εφόσον χρησιμοποιείται (κατασκευαστής, αρχή μετρήσεως),

— σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων (υλικό και λογισμικό).

2.2.3. **Διακρίβωση τον συστήματος**

— λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιείται για τη χάραξη της καμπύλης διακρίβωσης,

— πληροφορίες για τα κριτήρια ποιότητας της μεθόδου (π.χ. συντελεστής συσχέτισης, άθροισμα σφαλμάτων τετραγώνων κ.λπ.),

— στοιχεία σχετικά με κάθε περίπτωση παρέκτασης, υποθέσεων και προσεγγίσεων που έγιναν κατά την πειραματική διαδικασία και την αξιολόγηση και επεξεργασία δεδομένων,

— Κάθε μέτρηση που χρησιμοποιείται για τη χάραξη της καμπύλης διακριβώσεως πρέπει να τεκμηριώνεται σε ένα πίνακα που να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία νια κάθε σημείο διακρίβωσης:

  — ονομασία του δείγματος,

  — παρασκευαστής του δείγματος,

  — χαρακτηριστικές τιμές των προτύπων M_p, M_n, M_w, M_w/M_n όπως δίδονται από τον κατασκευαστή ή λαμβάνονται από διαδοχικές μετρήσεις, μαζί με λεπτομέρειες για τη μέθοδο προσδιορισμού:

  — όγκος εγχύσεως και συγκέντρωση εγχύσεως,

▼B

— τιμή M_p που χρησιμοποιείται νια τη διακρίβωση,

— όγκος εκλούσεως ή διορθωμένος χρόνος κατακράτησης που μετράται στα ανώτατα σημεία των κορυφών,

— M_p που υπολογίζεται στο ανώτατο σημείο της κορυφής,

— ποσοστιαίο σφάλμα της υπολογιζόμενης τιμής M_p και της τιμής διακρίβωσης.

2.2.4. **Αξιολόγηση**

— αξιολόγηση με βάση το χρόνο: μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να διασφαλιστεί η απαιτούμενη αναπαραγωγιμότητα (μέθοδος διόρθωσης, εσωτερικό πρότυπο κ.λπ.),

— πληροφορίες για το εάν η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με βάση τον όγκο εκλούσεως ή το χρόνο κατακράτησης,

— πληροφορίες σχετικά με τα όρια της αξιολόγησης εάν μία κορυφή δεν αναλύεται πλήρως,

— περιγραφή μεθόδων αμβλύνσεως, εάν χρησιμοποιήθηκαν,

— διαδικασία παρασκευής και προκατεργασίας του δείγματος,

— η παρουσία αδιάλυτων σωματιδίων, εάν υπήρχαν,

— όγκος εγχύσεως (ml) και συγκέντρωση εγχύσεως (mg/ml),

— παρατηρήσεις που δείχνουν επιδράσεις που οδηγούν σε αποκλίσεις από το θεωρητικό προφίλ GPC,

— λεπτομερή περιγραφή κάθε τροποποίησης των διαδικασιών δοκιμής,

— λεπτομέρειες για τις περιοχές σφαλμάτων,

— κάθε άλλη πληροφορία και παρατήρηση σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Eutions-mittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D. D. eds. (1979). Modern Size Exlcusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia. Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. Pennsylvania.

▼B

Προσάρτημα

Παραδείγματα άλλων μεθόδων για τον προσδιορισμό του αριθμητικού μέσου μοριακού βάρους ($M_η$) για πολυμερή

Η μέθοδος που προτιμάται για τον προσδιορισμό του $M_η$, ιδιαίτερα όταν υπάρχει διαθέσιμη σειρά από πρότυπα των οποίων η δομή είναι συγκρίσιμη με τη δομή του πολυμερούς, είναι η χρωματογραφία διεισδύσεως πηκτής (GPC). Εντούτοις, όπου υπάρχουν πρακτικές δυσκολίες στη χρήση της GPC ή είναι εκ των προτέρων αναμενόμενο ότι η ουσία δεν θα πληροί κάποιο θεσπισμένο κριτήριο $M_η$ (και το οποίο χρειάζεται επιβεβαίωση), υπάρχουν και εναλλακτικές διαθέσιμες μέθοδοι όπως

1. **Χρήση φυσικοχημικών ιδιοτήτων**

1.1. Ζεσεοσκοπία/Κρυοσκοπία:

Συνίσταται στη μέτρηση της ανύψωσης του σημείου ζέσεως (ζεσεοσκοπία) ή του υποβιβασμού του σημείου πήξεως (κρυοσκοπία) ενός διαλύτη, όταν προστίθεται το πολυμερές. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η επίδραση του διαλυόμενου πολυμερούς στο σημείο ζέσεως/πήξεως του υγρού εξαρτάται από το μοριακό βάρος του πολυμερούς (1)(2).

Δυνατότητα εφαρμογής: $M_n < 20\,000$.

1.2. Υποβιβασμός της τάσεως ατμών:

Συνίσταται στη μέτρηση της τάσεως ατμών ενός επιλεγμένου υγρού αναφοράς πριν και μετά την προσθήκη γνωστών ποσοτήτων πολυμερούς (1)(2).

Δυνατότητα εφαρμογής: $M_n < 20\,000$ (θεωρητικά, αφού στην πράξη υπάρχει περιορισμός).

1.3. Οσμομετρία μεμβράνης:

Βασίζεται στην αρχή της όσμωσης δηλαδή της φυσικής τάσης των μορίων των διαλυτών να διέρχονται διαμέσου ημιπερατής μεμβράνης από ένα αραιό σε ένα πυκνό διάλυμα για την επίτευξη ισορροπίας. Στη δοκιμή, το αραιό διάλυμα έχει μηδενική συγκέντρωση, ενώ το πυκνό διάλυμα περιέχει το πολυμερές. Το γεγονός της διέλευσης του διαλύτη διαμέσου της μεμβράνης προκαλεί την ανάπτυξη διαφορικής πιέσεως που εξαρτάται από τη συγκέντρωση και το μοριακό βάρος του πολυμερούς (1)(3)(4).

Δυνατότητα εφαρμογής M_n μεταξύ 20 000 και 200 000.

1.4. Οσμομετρία φάσης ατμών:

Συνίσταται στη σύγκριση της ταχύτητας εξατμίσεως αερολύματος καθαρού διαλύτη προς τρία τουλάχιστον αερολύματα που περιέχουν το πολυμερές σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1) (5) (6).

Δυνατότητα εφαρμογής $M < 20\,000$

▼B

2. **Ανάλυση τερματικών ομάδων**

Για να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος αυτή απαιτείται να είναι γνωστή τόσο η όλη δομή του πολυμερούς όσο και η φύση των τερματικών ομάδων της αλυσίδας (πράγμα που πρέπει να διακρίνεται από τον βασικό σκελετό με τη βοήθεια π.χ. NMR ή τιτλοδότησης/παραγωγοποίησης). Ο προσδιορισμός της μοριακής συγκεντρώσεως των τερματικών ομάδων που υπάρχουν στο πολυμερές μπορεί να οδηγήσει στην ανεύρεση μιας τιμής για το μοριακό βάρος (7)(8)(9).

Δυνατότητα εφαρμογής: M_n μέχρι 50 000 (με φθίνουσα αξιοπιστία).

3. **Παραπομπές**

(1) Billmeyer. F.W. Jr.. (1984) Textbook of Polymeer Science. 3rd Edn., John Wiley, New York

(2) Glover. C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights. Part I, P.E.. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials. Philadelphia. Pennsvlvania.

(4) Coll. H. (1989). Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight. A.R. Cooper ed.. J. Wiley and Sons. pp. 25o2.

(5) ASTMD 3592-77. (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure Osmometry'. In: Determination of Molecular Weight A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schroder, E. Muller. G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag. Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S, et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

Α.19. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η χρωμοτογραφική αυτή μέθοδος διείσδυσης πηκτής αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 119 (1996). Οι βασικές αρχές και άλλες τεχνικές πληροφορίες παρέχονται στην παραπομπή 1.

1.1. Εισαγωγή

Επειδή οι ιδιότητες των πολυμερών διαφέρουν πάρα πολύ, είναι αδύνατον να περιγραφεί μία μοναδική μέθοδος στην οποία να καθορίζονται επακριβώς οι συνθήκες για τον διαχωρισμό και την αξιολόγηση που να καλύπτουν όλες τις πιθανότητες και ειδικές περιπτώσεις που συναντώνται στο διαχωρισμό πολυμερών. Συχνά μάλιστα, σε ορισμένα πολύπλοκα πολυμερών συστήματα, δεν μπορεί να εφαρμοστεί η χρωματογραφία διείσδυσης πηκτής (GPC). Όταν η GPC είναι πρακτικά ανεφάρμοστη, το μοριακό βάρος μπορεί να προσδιοριστεί με άλλες μεθόδους (βλέπε παράρτημα). Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να δίδονται πλήρεις λεπτομέρειες και αιτιολόγηση.

Η περιγραφόμενη μέθοδος βασίζεται στο πρότυπο DIN 55672 (1). Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την εκτέλεση των πειραμάτων και την αξιολόγηση των δεδομένων μπορούν να αναζητηθούν σε αυτό το πρότυπο DIN. Στην περίπτωση που χρειάζονται τροποποιήσεις των πειραματικών συνθηκών, οι αλλαγές αυτές πρέπει να αιτιολογούνται. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα πρότυπα, εφόσον όμως γίνεται πλήρης αναφορά σε αυτά. Στην περιγραφόμενη μέθοδο χρησιμοποιούνται δείγματα πολυστυρολίου γνωστής πολυδιασπαρσιμότητας για διακρίβωση ενώ μπορεί να χρειάζεται να τροποποιηθούν για να είναι κατάλληλη για ορισμένα πολυμερή, π.χ. υδατοδιαλυτά και διακλαδισμένα με μακριές αλυσίδες πολυμερή.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Χαμηλό μοριακό βάρος ορίζεται αυθαίρετα ως το μοριακό βάρος το μικρότερο των 1 000 dalton.

Το αριθμητικό μέσο μοριακό βάρος (MJ και το σταθμικό μέσο μοριακό βάρος (M) προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

όπου:

H_i = είναι το επίπεδο του σήματος του ανιχνευτή από τη βασική γραμμή για τον όγκο κατακράτησης V_i,

M_i = είναι το μοριακό βάρος του κλάσματος του πολυμερούς στον όγκο κατακράτησης V_i και n είναι ο αριθμός των σημείων δεδομένων.

Το εύρος της κατανομής των μοριακών βαρών, το οποίο αποτελεί μέτρο της διασπαρσιμότητας του συστήματος, δίδεται από τη σχέση M_w/M_n.

▼B

1.3. Ουσίες αναφοράς

Επειδή η GPC είναι μία σχετική μέθοδος, πρέπει να γίνεται διακρίβωση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται συνήθως πρότυπα πολυστυρολίου. κατανεμημένα σε μία στενή περιοχή με γραμμική διαμόρφωση. με γνωστά μέσα μοριακά βάρη M_n και M_w και γνωστή κατανομή μοριακών βαρών. Η καμπύλη διακρίβωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του άγνωστου δείγματος μόνον εάν οι συνθήκες για το διαχωρισμό του δείγματος και των προτύπων έχουν επιλεγεί με ταυτόσημο τρόπο.

Κάθε προσδιοριζόμενη σχέση μεταξύ του μοριακού βάρους και του όγκου εκκλούσεως είναι έγκυρη μόνον υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος. Στις συνθήκες περιλαμβάνονται, κυρίως. η θερμοκρασία, ο διαλύτης (ή μείγμα διαλυτών), οι χρωματογραφικές συνθήκες και η στήλη ή το σύστημα στηλών διαχωρισμού.

Τα μοριακά βάρη του δείγματος που προσδιορίζονται με τον τρόπο αυτό είναι σχετικές τιμές και χαρακτηρίζονται ως «ισοδύναμα μοριακά βάρη πολυστυρολίου». Αυτό σημαίνει ότι ανάλογα με τις δομικές και χημικές διαφορές μεταξύ του δείγματος και των προτύπων, τα μοριακά βάρη μπορούν να αποκλίνουν από τις απόλυτες τιμές κατά ένα μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα πρότυπα, π.χ. πολυαιθυλενογλυκόλη, πολυαιθυλενοξείδιο, μεθακρυλικός πολυμεθυλεστέρας, πολυακρυλικό οξύ, θα πρέπει να δηλώνεται ο λόγος.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Η κατανομή των μοριακών βαρών του δείγματος και τα μέσα μοριακά βάρη (M_w και M_n) μπορούν να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας GPC. Η GPC είναι ένας ειδικός τύπος υγρής χρωματογραφίας στην οποία το δείγμα διαχωρίζεται ανάλογα με τους υδροδυναμικούς όγκους των επιμέρους συστατικών (2).

Ο διαχωρισμός επιτελείται καθώς το δείγμα διέρχεται από στήλη γεμισμένη με πορώδες υλικό, συνήθως μία οργανική πηκτή. Τα μικρά μόρια μπορούν να διεισδύουν στους πόρους ενώ τα μεγάλα μόρια αδυνατούν. Έτσι η διαδρομή των μεγάλων μορίων είναι μικρότερη και εκλούονται πρώτα. Τα μεσαίου μεγέθους μόρια διεισδύουν κάπως στους πόρους και εκλούονται αργότερα. Τα μικρότερα μόρια, με μέση υδροδυναμική ακτίνα μικρότερη από τους πόρους της πηκτής, μπορούν να διεισδύουν σε όλους τους πόρους. Αυτά εκλούονται τελευταία.

Θεωρητικά, ο διαχωρισμός εξαρτάται αποκλειστικά από το μέγεθος των μορίων, στην πράξη όμως είναι δύσκολο να αποφευχθεί η παρεμβολή, τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό, ορισμένων φαινομένων προσρόφησης. Η κατάσταση μπορεί να χειροτερεύσει από τυχόν μη ομοιόμορφη πλήρωση της στήλης και ύπαρξη κενών όγκων (2).

Η ανίχνευση πραγματοποιείται με τη βοήθεια π.χ. του δείκτη διάθλασης η της απορρόφησης στο UV, λαμβάνεται δε μία καμπύλη απλής κατανομής. Εντούτοις, για να παρέχει η καμπύλη πραγματικές τιμές μοριακών βαρών, είναι αναγκαίο η στήλη να διακριβώνεται διοχετεύοντας μέσα από αυτή πολυμερή γνωστού μοριακού βάρους και, στην ιδανική περίπτωση, παρόμοιας όσο το δυνατόν δομής π.χ. διάφορα πρότυπα πολυστυρολίου. Συνήθως λαμβάνεται μία καμπύλη Gauss, παραμορφωμένη μερικές φορές από μία μικρή ουρά προς την πλευρά των χαμηλών μοριακών βαρών. Ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την κατά βάρος ποσότητα των με διάφορα βάρη εκλουζόμενων κλασμάτων ενώ ο οριζόντιος άξονας δείχνει το λογαριθμικό μοριακό βάρος.

▼B

Η περιεκτικότητα σε χαμηλού μοριακού βάρους κλάσματα λαμβάνεται από αυτή την καμπύλη. Ο υπολογισμός μπορεί να είναι ορθός μόνον εφόσον τα χαμηλού μοριακού βάρους κλάσματα έχουν ισοδύναμη κατά μάζα αντιστοιχία με το πολυμερές ως σύνολο.

1.5. Κριτήριο ποιότητας

Η επαναληψιμότητα (σχετική τυπική απόκλιση: ΣΤΑ) του όγκου έκλουσης θα πρέπει να είναι καλύτερη του 0,3 %. Εάν ένα χρωματογράφημα αξιολογείται σε εξάρτηση από το χρόνο και δεν πληροί το ανωτέρω αναφερθέν κριτήριο (1), η απαιτούμενη για την ανάλυση επαναληψιμότητα πρέπει να διασφαλίζεται διορθώνοντας την με ένα εσωτερικό πρότυπο. Οι πολυδιασπαρσιμότητες εξαρτώνται από τα μοριακά βάρη των προτύπων. Στην περίπτωση των προτύπων πολυστυρολίου οι συνήθεις τιμές είναι:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 < M_p < 10$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10'$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p είναι το μοριακό βάρος του προτύπου στο ανώτατο σημείο της κορυφής).

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1. **Παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων πολυστυρολίου**

Τα πρότυπα πολυστυρολίου διαλύονται με επισταμένη ανάμειξη στο επιλεγμένο εκλουστικό μέσον. Κατά την παρασκευή των διαλυμάτων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι οδηγίες του κατασκευαστή

Οι συγκεντρώσεις των επιλεγόμενων προτύπων εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, π.χ. από τον όγκο έγχυσης, το ιξώδες του διαλύματος και την ευαισθησία του αναλυτικού ανιχνευτή. Ο μέγιστος όγκος έγχυσης πρέπει να προσαρμόζεται στο μήκος της στήλης για να αποφεύγεται τυχόν υπερφόρτιση. Οι συνήθεις όγκοι έγχυσης για αναλυτικούς διαχωρισμούς με GPC και στήλη 30 cm × 7,8 mm, είναι κανονικά μεταξύ 40 και 100 ml. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και μεγαλύτεροι όγκοι, αυτοί όμως δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 250 ml. Πριν από τη διακρίβωση της στήλης πρέπει να προσδιορίζεται ποια είναι η άριστη σχέση μεταξύ του όγκου έγχυσης και της συγκεντρώσεως.

1.6.2. **Παρασκευή του διαλύματος του δείγματος**

Για την παρασκευή των διαλυμάτων του δείγματος ισχύουν κατ' αρχήν οι ίδιες απαιτήσεις. Το δείγμα διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη, π.χ. τετραϋδροφουράνιο (THF), με προσεκτική ανακίνηση. Σε καμία περίπτωση δεν 5α πρέπει να διαλύεται με χρήση λουτρού υπερήχων. Εφόσον απαιτείται, το διάλυμα του δείγματος καθαρίζεται μέσω φίλτρου μεμβράνης με μέγεθος πόρων μεταξύ 0,2 και 2 μm.

Εάν υπάρχουν αδιάλυτα σωματίδια, αυτό πρέπει να αναγράφεται στην τελική έκθεση γιατί αυτά μπορεί να οφείλονται σε κλάσματα υψηλού μοριακού βάρους. Για τον προσδιορισμό του κατά βάρος ποσοστού των αδιάλυτων σωματιδίων θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία κατάλληλη μέθοδος. Τα διαλύματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μέσα σε 24 ώρες.

▼B

1.6.3. **Διόρθωση για να ληφθεί υπόψη η ύπαρξη προσθέτων και προσμείξεων**

Συνήθως είναι αναγκαίο να γίνεται διόρθωση της περιεκτικότητας σε κλάσματα με M < 1 000 προκειμένου να ληφθεί υπόψη η παρουσία μη πολυμερών ειδικών συστατικών (π.χ. προσμείξεις ή/και πρόσθετα), εκτός κι αν η μετρούμενη περιεκτικότητα είναι ήδη < 1 %. Αυτό γίνεται με άμεση ανάλυση του διαλύματος του πολυμερούς ή του εκλούσματος GPC.

Στις περιπτώσεις όπου το έκλουσμα, μετά τη διέλευση από τη στήλη, είναι πολύ αραιό για να μπορέσει να γίνει περαιτέρω προσδιορισμός, τότε αυτό πρέπει να συμπυκνώνεται. Μπορεί επίσης να χρειάζεται το έκλουσμα να εξατμιστεί μέχρι ξηρού και να επαναδιαλυθεί. Η συμπύκνωση του εκλούσματος πρέπει να γίνεται υπό συνθήκες που να διασφαλίζουν ότι δεν πρόκειται να υπάρξει καμία αλλαγή στο έκλουσμα. Η κατεργασία του εκλούσματος μετά το στάδιο της GPC εξαρτάται από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

1.6.4. **Συσκευές**

Η συσκευή GPC συμπεριλαμβάνει τα ακόλουθα:

— δοχείο διαλύτη

— απαεριωτής (όπου χρειάζεται)

— αντλία

— αποσβεστήρας παλμών (όπου χρειάζεται)

— σύστημα εγχύσεων

— στήλες χρωματογραφίας

— ανιχνευτής

— ροόμετρο (όπου χρειάζεται)

— καταγραφέας-επεξεργαστής δεδομένων

— δοχείο αποβλήτων.

Πρέπει να διασφαλίζεται ότι το σύστημα GPC είναι αδρανές έναντι των χρησιμοποιουμένων διαλυτών (π.χ. χρησιμοποιώντας χαλύβδινα τριχοειδή για το διαλύτη THF).

1.6.5. **Έγχυση και σύστημα παροχής διαλύτη**

Ορισμένος όγκος του διαλύματος του δείγματος φέρεται στη στήλη χρησιμοποιώντας είτε αυτόματο δειγματολήπτη είτε με τα χέρια σε μία επακριβώς καθορισμένη ζώνη. Εάν η εργασία γίνεται με τα χέρια. πρέπει να αποφεύγεται κάθε απότομο τράβηγμα ή πίεση του εμβόλου της σύριγγας γιατί κάτι τέτοιο μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στη μετρούμενη κατανομή μοριακών βαρών. Τα σύστημα παροχής του διαλύτη θα πρέπει, όσο το δυνατόν, να μην επηρεάζεται θεωρητικά από παλμούς με τη βοήθεια ενός αποσβεστήρα παλμών. Η ταχύτητα ροής είναι της τάξης του 1 ml/min.

1.6.6. **Στήλη**

Η αναγνώριση του πολυμερούς γίνεται, ανάλογα με το δείγμα, είτε με μία απλή στήλη είτε με περισσότερες από μία στήλες συνδεδεμένες διαδοχικά. Στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά πορώδη για στήλες υλικά με καθορισμένες ιδιότητες (π.χ. μέγεθος πόρων, όρια αποκλεισμού). Η επιλογή της πηκτής διαχωρισμού ή του μήκους της στήλης εξαρτάται τόσον από τις ιδιότητες του δείγματος (υδροδυναμικός όγκος, κατανομή μοριακών βαρών) όσο και από τις ειδικές συνθήκες για το διαχωρισμό όπως ο διαλύτης, η θερμοκρασία και η ταχύτητα ροής (I) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Θεωρητικές πλάκες**

Η στήλη ή ο συνδυασμός των στηλών που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πρέπει να χαρακτηρίζονται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Αυτό σημαίνει ότι στην περίπτωση όπου ως διαλύτης εκλούσεως χρησιμοποιείται THF, θα πρέπει να γίνεται φόρτιση στήλης γνωστού μήκους με διάλυμα αιθυλοβενζολίου ή άλλου κατάλληλου μη πολικού διαλελυμένου σώματος. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών δίδεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$N = 5,54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{ή} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

όπου:

N = είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών

V_e = είναι ο όγκος εκλούσεως στο ανώτατο σημείο της κορυφής

W = είναι το πλάτος της γραμμής βάσεως της κορυφής

$W_{1/2}$ = είναι το πλάτος της κορυφής στο ήμισυ του ύψους της.

1.6.8. **Ικανότητα διαχωρισμού**

Εκτός από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών, που είναι ένα μέγεθος που προσδιορίζει το εύρος της ζώνης, ένα μέρος εξαρτάται και από την ικανότητα διαχωρισμού, μέγεθος που προσδιορίζεται από το βαθμό κλίσεως της καμπύλης διακριβώσεως. Η ικανότητα διαχωρισμού μίας στήλης βρίσκεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{εμβαδόν εγκάρσιας διατομής στήλης}} \geq 6,0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

όπου:

V_{eMx} = είναι ο όγκος εκλούσεως για πολυστυρόλιο με μοριακό βάρος M_χ

$V_{e(10Mx)}$ = είναι ο όγκος εκλούσεως για πολυστυρόλιο με δεκαπλάσιο μοριακό βάρος.

Η αναλυτική ικανότητα του συστήματος ορίζεται συνήθως ως εξής:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

όπου:

V_{e1}, V_{e2} = είναι οι όγκοι εκλούσεως των δύο προτύπων πολυστυρολίου στο μέγιστο της κορυφής,

W_1, W_2 = είναι τα πλάτη της κορυφής στη γραμμή βάσεως

M_1, M_2 = είναι τα μοριακά βάρη στο μέγιστο της κορυφής (που πρέπει να διαφέρουν κατά ένα συντελεστή 10)

Η τιμή R για το σύστημα στηλών θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Διαλύτες**

Όλοι οι διαλύτες πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (για το THF απαιτείται καθαρότητα 99,5 %). Το δοχείο του διαλύτη (το οποίο, εφόσον χρειάζεται, πρέπει να είναι σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου) πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο για τη διακρίβωση της στήλης και την ανάλυση αρκετών δειγμάτων. Ο διαλύτης πρέπει να απαεριώνεται πριν μεταφερθεί στη στήλη μέσω της αντλίας

1.6.10. **Έλεγχος θερμοκρασίας**

Η θερμοκρασία των κρίσιμων εσωτερικών εξαρτημάτων (βρόχος εγχύσεως, στήλες, ανιχνευτής και σωληνώσεις) 5α πρέπει να είναι σταθερή και κατάλληλη για τον επιλεγέντα διαλύτη.

1.6.11. **Ανιχνευτής**

Σκοπός του ανιχνευτή είναι να καταγράφει ποσοτικώς τη συγκέντρωση του δείγματος που εκλούζεται από τη στήλη. Για να αποφεύγεται άσκοπη διεύρυνση των κορυφών, ο όγκος της κυψελίδας του ανιχνευτή πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος. Η τιμή του όγκου δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 10 ml εκτός από την περίπτωση ανιχνευτών διάχυσης του φωτός και ιξώδους. Για την ανίχνευση χρησιμοποιείται συνήθως διαφορική διαθλασιμετρία. Εντούτοις, εφόσον το επιβάλλουν οι συγκεκριμένες ιδιότητες του δείγματος ή του διαλύτη εκλούσεως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι τύποι ανιχνευτών, π.χ. UV/VIS, IR, ανιχνευτές ιξώδους κ.λπ.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

2.1. Δεδομένα

Για τα λεπτομερή κριτήρια αξιολόγησης καθώς επίσης και τις απαιτήσεις που σχετίζονται με τη συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων, θα πρέπει να γίνεται αναφορά στο πρότυπο DIN (1).

Για κάθε δείγμα πρέπει να πραγματοποιούνται δύο ανεξάρτητα πειράματα και να γίνονται επιμέρους αναλύσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις, παίζει σημαντικό ρόλο το να λαμβάνονται επίσης μετρήσεις και από τυφλά τα οποία έχουν υποβληθεί σε κατεργασία από τις ίδιες συνθήκες με εκείνες του δείγματος.

Είναι αναγκαίο να αναφέρεται ρητώς, ότι οι μετρούμενες τιμές είναι σχετικές τιμές ισοδύναμες με *τα* μοριακά βάρη του χρησιμοποιούμενου προτύπου.

Μετά τον προσδιορισμό των όγκων κατακράτησης ή των χρόνων κατακράτησης (διορθωμένων πιθανόν με βάση ένα εσωτερικό πρότυπο), κατασκευάζεται γραφική παράσταση των τιμών log M (M είναι τα ανώτατα σημεία των κορυφών των προτύπων διακριβώσεως) συναρτήσει μίας από τις ποσότητες αυτές. Για κάθε δεκάδα μοριακών βαρών απαιτούνται τουλάχιστον δύο σημεία διακρίβωσης ενώ, για τη συνολική καμπύλη, απαιτούνται τουλάχιστον πέντε σημεία μετρήσεως, σημεία που θα πρέπει να καλύπτουν το εκτιμώμενο μοριακό βάρος του δείγματος. Το προς τα χαμηλά μοριακά βάρη ακραίο σημείο της καμπύλης διακριβώσεως ορίζεται από ηεξυλοβενζόλιο ή άλλη κατάλληλη μη πολική διαλυμένη ουσία. Προσδιορίζεται το τμήμα της καμπύλης που αντιστοιχεί σε μοριακά βάρη κάτω του 1 000 και διορθώνεται κατάλληλα ώστε να ληφθούν υπόψη τα πρόσθετα και οι προσμείξεις. Οι καμπύλες εκλούσεως αξιολογούνται εν γένει με επεξεργασία ηλεκτρονικών δεδομένων. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται διά χειρός ψηφιοποίηση, μπορεί κανείς να κάνει χρήση του ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Αν στη στήλη κατακρατηοεί τυχόν αδιάλυτο πολυμερές, το μοριακό του βάρος είναι πιθανό να είναι υψηλότερο από εκείνο του διαλυτού κλάσματος και εάν δεν ληφθεί υπόψη αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της περιεκτικότητας σε κλάσματα χαμηλού μοριακού βάρους. Οδηγίες για τη διόρθωση της περιεκτικότητας σε κλάσματα χαμηλού μοριακού βάρους προκειμένου να ληφθεί υπόψη τυχόν αδιάλυτο πολυμερές δίδονται στο παράρτημα.

Η καμπύλη κατανομής πρέπει να παρέχεται με τη μορφή πίνακα ή εικόνας (διαφορική συχνότητα ή αθροιστικά ποσοστά συναρτήσει του log M). Στη γραφική παράσταση, μία δεκάδα μοριακών βαρών θα πρέπει κανονικά να αντιστοιχεί σε πλάτος περίπου 4 cm ενώ το μέγιστο της κορυφής θα πρέπει να είναι σε ύψος περίπου 8 cm. Στην περίπτωση ολοκληρωμένων καμπυλών κατανομής η διαφορά στην τεταγμένη μεταξύ 0 και 100 % θα πρέπει να είναι περίπου 10 cm.

2.2. Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμή; πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1. **Υπό δοκιμή ουσία**

— υπάρχουν στοιχεία για την υπό δοκιμή ουσία (ταυτότητα, πρόσθετα, προσμείξεις)

— περιγραφή της κατεργασίας του δείγματος, παρατηρήσεις, προβλήματα.

2.2.2. **Εξοπλισμός**

— περιέκτης εκλουστικού μέσου, αδρανές αέριο, απαερίωση του εκλουστικού μέσου, σύσταση του εκλουστικού μέσου, προσμείξεις,

— αντλία, αποσβεστήρας παλμών, σύστημα εγχύσεως,

— στήλες διαχωρισμού (κατασκευαστής, όλα τα σχετικά με τα χαρακτηριστικά των στηλών όπως μέγεθος πόρων, είδος υλικού διαχωρισμού κ.λπ., αριθμός, μήκος και σειρά των χρησιμοποιηθεισών στηλών),

— αριθμός των θεωρητικών πλακών της στήλης (ή συνδυασμού), ικανότητα διαχωρισμού (αναλυτική ικανότητα του συστήματος),

— πληροφορίες για τη συμμετρία των κορυφών,

— θερμοκρασία στηλών, τρόπος ελέγχου της θερμοκρασίας,

— ανιχνευτής (αρχή μετρήσεως, τύπος, όγκος κυψελίδας),

— ρούμετρο, εφόσον χρησιμοποιείται (κατασκευαστής, αρχή μετρήσεως),

— σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων (υλικό και λογισμικό).

2.2.3. **Διακρίβωση του συστήματος**

— λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιείται για τη χάραξη της καμπύλης διακρίβωσης,

▼B

— πληροφορίες για τα κριτήρια ποιότητας της μεθόδου (π.χ. συντελεστής συσχέτισης, άθροισμα σφαλμάτων τετραγώνων κ.λπ.),

— στοιχεία σχετικά με κάθε περίπτωση παρέκτασης, υποθέσεων και προσεγγίσεων που έγιναν κατά την πειραματική διαδικασία και την αξιολόγηση και επεξεργασία δεδομένων,

— κάθε μέτρηση που χρησιμοποιείται για τη χάραξη της καμπύλης διακριβώσεως πρέπει να τεκμηριώνεται σε ένα πίνακα που να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία για κάθε σημείο διακρίβωσης:

  — ονομασία του δείγματος,

  — παρασκευαστής του δείγματος,

  — χαρακτηριστικές τιμές των προτύπων M, M, M, M/M_{η}, όπως δίδονται από τον κατασκευαστή ή λαμβάνονται από διαδοχικές μετρήσεις, μαζί με λεπτομέρειες για τη μέθοδο προσδιορισμού,

  — όγκος εγχύσεως και συγκέντρωση εγχύσεως,

  — τιμή M_p που χρησιμοποιείται για τη διακρίβωση,

  — όγκος εκλούσεως ή διορθωμένος χρόνος κατακράτησης που μετράται στα ανώτατα σημεία των κορυφών,

  — M_p που υπολογίζεται στο ανώτατο σημείο της κορυφής

  — ποσοστιαίο σφάλμα της υπολογιζόμενης τιμής M_p και της τιμής διακρίβωσης.

2.2.4. **Πληροφορίες για την περιεκτικότητα σε χαμηλού μοριακού βάρους πολυμερές**

— περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση και του τρόπου με τον οποίο διεξήχθησαν τα πειράματα,

— πληροφορίες σχετικά με το ποσοστό των χαμηλού βάρους κλασμάτων (w/w) σε σχέση με το συνολικό δείγμα,

— πληροφορίες για τυχόν προσμείξεις, πρόσθετα και άλλες μη πολυμερείς ουσίες ως ποσοστό κατά βάρος του συνολικού δείγματος.

2.2.5. **Αξιολόγηση**

— αξιολόγηση με βάση το χρόνο: μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να διασφαλιστεί η απαιτούμενη αναπαραγωγιμότητα (μέθοδος διόρθωσης, εσωτερικό πρότυπο κ.λπ.),

— πληροφορίες για το εάν η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με βάση τον όγκο εκλούσεως ή το χρόνο κατακράτησης,

— πληροφορίες σχετικά με τα όρια της αξιολόγησης εάν μία κορυφή δεν αναλύεται πλήρως,

— περιγραφή μεθόδων αμβλύνσεως. εάν χρησιμοποιήθηκαν,

— διαδικασία παρασκευή; και προκατεργασίας του δείγματος,

— η παρουσία αδιάλυτων σωματιδίων, εάν υπήρχαν,

▼B

— όγκος εγχύσεως (ml) και συγκέντρωση εγχύσεως (mg/ml),

— παρατηρήσεις που δείχνουν επιδράσεις που οδηγούν σε αποκλίσεις από το θεωρητικό προφίλ GPC,

— λεπτομερή περιγραφή κά3ε τροποποίησης των διαδικασιών δοκιμής,

— λεπτομέρειες για τις περιοχές σφαλμάτων,

— κάοε άλλη πληροφορία και παρατήρηση σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) DIN 55672 (1995). Geidpermeationschromaiographie (GPC) luit Tetfahydrofuran (THF) als Elu-tionsmittel, Teil 1

(2) Yau. W.W, Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography. J.Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystvrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. Pennsylvania.

▼B

Προσάρτημα

Οδηγίες για τη διόρθωση της περιεκτικότητας σε κλάσματα χαμηλού μοριακού βάρους λόγω της παρουσίας αδιάλυτου πολυμερούς

Όταν σε ένα δείγμα υπάρχει αδιάλυτο πολυμερές, το γεγονός αυτό απολήγει σε απώλεια μάζας κατά τη διάρκεια της ανάλυσης GPC. Το αδιάλυτο πολυμερές κατακρατείται ανεπίστρεπτα στη στήλη ή στο φίλτρο του δείγματος ενώ το διαλυτό τμήμα του δείγματος διέρχεται διαμέσου της στήλης. Στην περίπτωση όπου μπορεί να εκτιμηθεί ή να μετρηθεί η διαφορική αύξηση (dn/dc) του δείκτη διαθλάσεως του πολυμερούς, μπορούμε να εκτιμήσουμε την απωλεσθείσα μάζα μείγματος τη στήλη. Στην περίπτωση αυτή, προβαίνουμε σε διόρθωση χρησιμοποιώντας μία εξωτερική διακρίβωση με πρότυπα υλικά γνωστής συγκεντρώσεως και dn/dc για τη διακρίβωση της απόκρισης του διαθλασιμέτρου. Στο παράδειγμα που ακολουθεί, χρησιμοποιείται πρότυπο πολύ (μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (ρMMA).

Στην εξωτερική διακρίβωση για την ανάλυση ακρυλικών πολυμερών, αναλύεται με GPC ένα πρότυπο ρPMMA γνωστής συγκεντρώσεως σε τετραϋδραφουράνιο και τα προκύπτοντα δεδομένα χρησιμοποιούνται για την εύρεση της σταθεράς του διαθλασιμέτρου σύμφωνα με την εξίσωση:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

όπου

K = είναι η σταθερά διαθλασιμέτρου (σε microvolt.seconde/ml)

R = είναι η απόκριση του προτύπου pMMA (σε microvolt.second)

C = είναι η συγκέντρωση του προτύπου pMMA (σε mg/ml)

V = είναι ο όγκος εγχύσεως (σε ml)

dn/dc = είναι η διαφορική αύξηση του δείκτη διαθλάσεως για το pMMA σε τετραϋδροφουράνιο (σε ml/mg).

Τα δεδομένα που ακολουθούν αποτελούν συνήθη δεδομένα για ένα πρότυπο pMMA

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

Η προκύπτουσα για το K τιμή ($3,05 \times 10^{11}$) χρησιμοποιείται κατόπιν για τον υπολογισμό της θεωρητικής απόκρισης του ανιχνευτή εφόσον μέσω του ανιχνευτή έχουν εκλουστεί το 100 % του εγχυθέντος πολυμερούς.

▼B

Α.20. **ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΔΙΑΛΥΣΕΩΣ/ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η περιγραφόμενη μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της αναθεωρημένης έκδοσης του OECD TG 120 (1997). Περισσότερες τεχνικές πληροφορίες δίδονται στην παραπομπή (1).

1.1. Εισαγωγή

Για ορισμένα πολυμερή, όπως τα πολυμερή γαλακτώματος, πριν να χρησιμοποιηθεί η παρακάτω περιγραφόμενη μέθοδος μπορεί να χρειάζεται κάποια αρχική προκαταρκτική εργασία. Η μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε υγρά πολυμερή και σε πολυμερή που αντιδρούν με το νερό υπό τις συνθήκες της δοκιμής.

Όταν η μέθοδος δεν είναι δυνατή ή πρακτικά εφαρμόσιμη, η συμπεριφορά διαλύσεως/εκχύλισης μπορεί να μελετηθεί με άλλες μεθόδους. Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να δίδονται πλήρεις λεπτομέρειες και αιτιολόγηση της χρησιμοποιούμενης μεθόδου.

1.2. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.3. Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Η συμπεριφορά διαλύσεως/εκχύλισης των πολυμερών σε υδατικό μέσον προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της σφαιρικής φιάλης (βλέπε Α.6. Υδατοδιαλυτότητα — μέθοδος σφαιρικής φιάλης) με τις τροποποιήσεις που περιγράφονται παρακάτω.

1.4. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.5. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής

1.5.1. **Εξοπλισμός**

Για τη μέθοδο απαιτείται ο ακόλουθος εξοπλισμός:

— συσκευή κονιορτοποίησης π.χ. αλεστικό μηχάνημα για την παραγωγή σωματιδίων γνωστού μεγέθους,

— συσκευή ανακίνησης με δυνατότητα ελέγχου της θερμοκρασίας,

— σύστημα με φίλτρο μεμβράνης,

— κατάλληλος αναλυτικός εξοπλισμός,

— τυποποιημένα κόσκινα.

1.5.2. **Παρασκευή δείγματος**

Κατ' αρχήν πρέπει να λαμβάνεται ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα με μέγεθος σωματιδίων μεταξύ 0,125 και 0,25 mm χρησιμοποιώντας κατάλληλα κόσκινα. Για τη σταθερότητα του δείγματος ή για τη διαδικασία αλέσεως μπορεί να απαιτείται ψύξη. Υλικά ελαστικής φύσεως μπορούν να αλέθονται σε θερμοκρασία υγρού αζώτου (Γ).

Εάν δεν μπορεί να ληφθεί το απαιτούμενο σε μέγεθος σωματιδίων κλάσμα, θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν μεγαλύτερη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και να αναφέρεται στην έκθεση το αποτέλεσμα. Στην έκθεση πρέπει να αναφέρεται και ο τρόπος με τον οποίο το αλεσθέν δείγμα αποθηκεύτηκε πριν από τη δοκιμή.

▼B

1.5.3. **Διαδικασία**

Σε τρεις φιάλες με γυάλινα πώματα ζυγίζεται σε κάθε μία από ένα δείγμα των 10 g της υπό δοκιμή ουσίας και σε κάθε φιάλη προστίθενται 1 000 ml νερό. Εάν ο χειρισμός μίας τέτοιας ποσότητας 10 g πολυμερούς είναι πρακτικώς αδύνατος, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η αμέσως επόμενη δυνατή μεγαλύτερη ποσότητα και να προσαρμόζεται ανάλογα ο όγκος του νερού.

Οι Φιάλες πωματίζονται ερμητικά και στη συνέχεια ανακινούνται στους 20 °C. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται συσκευή ανακίνησης ή ανάδευσης που να μπορεί να λειτουργεί σε σταθερή θερμοκρασία. Μετά από 24 ώρες, το περιεχόμενο κάθε φιάλης φυγοκεντρείται ή διηθείται και προσδιορίζεται η συγκέντρωση του πολυμερούς στη διαυγή υδατική Φάση με μία κατάλληλη αναλυτική μέθοδο. Εάν δεν υπάρχουν κατάλληλες αναλυτικές μέθοδοι για την υδατική φάση, η συνολική διαλυτότητα/εκχυλισιμότητα μπορεί να εκτιμηθεί από το ξηρό βάρος του υπολείμματος του φίλτρου ή του φυγοκεντρημένου ιζήματος.

Συνήθως, είναι αναγκαίο να γίνεται ξεχωριστός ποσοτικός προσδιορισμός των προσμείξεων και προσθέτων αφενός και του χαμηλού μοριακού βάρους πολυμερούς αφετέρου. Στην περίπτωση σταθμικού προσδιορισμού, σημαντικό ρόλο παίζει επίσης να εκτελείται και ένα λευκό πείραμα χωρίς υπό δοκιμή ουσία για να υπολογίζονται τα υπολείμματα που προέρχονται από την πειραματική διαδικασία.

Η συμπεριφορά διαλύσεως/εκχύλισης των πολυμερών στο νερό στους 37 °C σε pH2 και pH9 μπορεί να προσδιοριστεί όπως περιγράφτηκε για την διεξαγωγή του πειράματος στους 20 °C. Οι τιμές του pH μπορούν να επιτευχθούν με την προσθήκη είτε κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων είτε με κατάλληλα οξέα ή βάσεις όπως το υδροχλωρικό οξύ, το οξικό οξύ, υδροξείδιο του νατρίου ή καλίου αναλυτικής καθαρότητας ή με NH_3.

Ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο αναλύσεως, θα πρέπει να εκτελούνται μία ή δυο δοκιμές. Όταν για το πολυμερές υπάρχουν διαθέσιμες επαρκώς εξειδικευμένες μέθοδοι για την άμεση ανάλυση της υδατικής φάσης, αρκεί συνήθως μία δοκιμή όπως περιγράφεται παραπάνω. Εντούτοις, όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμες τέτοιες μέθοδοι και ο προσδιορισμός της συμπεριφοράς διαλύσεως/'εκχυλίσεως του πολυμερούς περιορίζεται σε έμμεση ανάλυση με προσδιορισμό μόνον της συνολικής περιεκτικότητας του υδατικού εκχυλίσματος σε οργανικό άνθρακα (TOC), θα πρέπει να διεξάγεται και μία πρόσθετη δοκιμή. Η πρόσθετη αυτή δοκιμή θα πρέπει επίσης να γίνεται εις τριπλούν, χρησιμοποιώντας υποδεκαπλάσιου μεγέθους δείγμα πολυμερούς και τις ίδιες ποσότητες νερού με εκείνες που χρησιμοποιούνται στην πρώτη δοκιμή.

1.5.4. **Ανάλυση**

1.5.4.1. *Δοκιμή εκτελούμενη με δείγμα ενός μεγέθους*

Για την άμεση ανάλυση του πολυμερούς στην υδατική φάση ενδέχεται να υπάρχουν κάποιες διαθέσιμοι μέθοδοι. Εναλλακτικά, μπορεί να εξεταστεί επίσης και η εφαρμογή έμμεσης ανάλυσης του διαλελυμένου/εκχυλισμένου πολυμερούς, με τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε διαλυτά μέρη και διόρθωση της τιμής ώστε να ληφθούν υπόψη τα μη πολυμερή συστατικά.

Ανάλυση της υδατικής φάσης για την ανεύρεση της συνολικής περιεκτικότητας σε πολυμερή μπορεί να γίνει:

είτε με μία επαρκώς ευαίσθητη μέθοδο, π.χ.:

— προσδιορισμό του TOC με διάσπαση με υπερθειικά ή διχρωμικά για *τη* λήψη CO, και εύρεση στη συνέχεια της περιεκτικότητας με IR ή με χημική ανάλυση,

▼B

— φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS) ή την ισοδύναμη της ICP (Inductively Coupled Piasma) για πολυμερή που περιέχουν πυρίτιο ή μέταλλα,

— απορρόφηση στο υπεριώδες ή φασματοφθορισμομετρία για ακρυλικά πολυμερή,

— LC-MS για δείγματα χαμηλού μοριακού βάρους,

είτε με εξάτμιση υπό κενό μέχρι ξηράνσεως του υδατικού εκχυλίσματος και φασματοσκοπική (IR, UV κ.λπ.) ή AAS/ICP ανάλυση του υπολείμματος.

Εάν δεν είναι πρακτικώς δυνατή η ανάλυση της υδατικής φάσης με τον τρόπο αυτό. το υδατικό εκχύλισμα θα πρέπει να εκχυλίζεται με ένα μη αναμείξιμο με το νερό οργανικό διαλύτη π.χ. με κάποιο χλωριωμένο υδρογονάνθρακα. Ο διαλύτης κατόπιν εξατμίζεται και το υπόλειμμα αναλύεται ως ανωτέρω για την εύρεση της περιεκτικότητας του πολυμερούς. Τυχόν συστατικά του υπολείμματος αυτού που ταυτοποιούνται ως προσμείξεις ή πρόσθετα πρέπει να αφαιρούνται προκειμένου να προσδιοριστεί ο βαθμός διαλύσεως- εκχυλίσεως του ίδιου του πολυμερούς.

Όταν υπάρχουν παρούσες σχετικά μεγάλες ποσότητες τέτοιων υλικών, μπορεί να είναι αναγκαίο το υπόλειμμα να υποβληθεί σε ανάλυση π.χ. με HPLC ή GC για τη διαφοροποίηση των προσμείξεων από το μονομερές και τις εκ του μονομερούς περιεχόμενες ουσίες έτσι ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί η πραγματική συγκέντρωση του τελευταίου.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να αρκεί απλή εξάτμιση του οργανικού διαλύτη μέχρι ξηρού και ζύγιση του ξηρού υπολείμματος.

1.5.4.2. *Δοκιμή εκτελούμενη με δύο διαφορετικά μεγέθη δειγμάτων*

Όλα τα υδατικά εκχυλίσματα αναλύονται για TOC.

Εκτελείται σταθμικός προσδιορισμός στο αδιάλυτο/μη εκχυλισθέν μέρος του δείγματος. Εάν, μετά τη φυγοκέντρηση ή τη διήθηση του περιεχομένου κάθε Φιάλης, στο τοίχωμα της φιάλης παραμένουν προσκολλημένα υπολείμματα πολυμερούς, η φιάλη θα πρέπει να εκπλύνεται με το διήθημα μέχρις ότου στη φιάλη να μη φαίνεται ίχνος υπολείμματος. Ακολούθως, το διήθημα επαναφυγοκεντρείται ή επαναδιηθείται. Τα υπολείμματα που παραμένουν στο φίλτρο ή στο σωλήνα φυγοκεντρήσεως ξηραίνονται στους 40 ºC υπό κενό και ζυγίζονται. Η ξήρανση συνεχίζεται μέχρις επιτεύξεως σταθερού βάρους.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. Δοκιμή εκτελούμενη με δείγμα ενός μεγέθους

Θα πρέπει να δίδονται τα επιμέρους αποτελέσματα για κάθε μία από τις τρεις φιάλες και οι μέσες τιμές εκφρασμένες σε μονάδες μάζας κατ' όγκο του διαλύματος (συνήθως mg/1) ή σε μονάδες μάζας κατά μάζα του δείγματος του πολυμερούς (συνήθως mg/g). Επιπλέον, θα πρέπει να δίδεται και η απώλεια βάρους του δείγματος (υπολογιζόμενη ως βάρος του διαλελυμένου σώματος διηρημένο διά του βάρους του αρχικού δείγματος), ενώ θα πρέπει να υπολογίζονται και οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (ΣΤΑ). Επίσης θα πρέπει να δίδονται επιμέρους στοιχεία αφενός για το σύνολο της ουσίας (πολυμερές + βασικά πρόσθετα κ.λπ.) και αφετέρου αποκλειστικά και μόνο για το πολυμερές (δηλαδή έπειτα από αφαίρεση της συνεισφοράς των προσθέτων αυτών).

▼B

2.2. Δοκιμή εκτελούμενη με δύο διαφορετικά μεγέθη δειγμάτων

Θα πρέπει να δίδονται οι επιμέρους τιμές TOC των υδατικών εκχυλισμάτων των δύο τριπλών πειραμάτων και η μέση τιμή για κάθε πείραμα, εκφρασμένες σε μονάδες μάζας κατ' όγκο του διαλύματος (συνήθως mgC/1), καθώς επίσης και σε μονάδες μάζας ανά μονάδα βάρους του αρχικού δείγματος (συνήθως mgC/1).

Εάν, μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται υπό την υψηλή και χαμηλή αναλογία δείγματος/νερού δεν υπάρχει καμία διαφορά, αυτό μπορεί να σημαίνει ότι εκχυλίστηκαν πράγματι όλα τα εκχυλίσιμα συστατικά. Σε μία τέτοια περίπτωση, δεν χρειάζεται κανονικά να πραγματοποιηθεί άμεση ανάλυση.

Θα πρέπει να δίδονται τα επιμέρους βάρη των υπολειμμάτων εκφρασμένα ως εκατοστιαίο ποσοστό των αρχικών βαρών των δειγμάτων, ενώ ανά πείραμα θα πρέπει να υπολογίζεται η μέση τιμή. Οι διαφορές που βρίσκονται μεταξύ 100 και των εκατοστιαίων ποσοστών αντιπροσωπεύουν τα ευρεθέντα ποσοστά διαλυτού και εκχυλίσιμου υλικού στο αρχικό δείγμα.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΤΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. Έκθεση δοκιμής

Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

3.1.1. **Υπό δοκιμή ουσία**

— υπάρχουσες πληροφορίες για την υπό δοκιμή ουσία (ταυτότητα, πρόσθετα, προσμείξεις, περιεκτικότητα σε πολυμερές χαμηλού μοριακού βάρους).

3.1.2. **Πειραματικές συνθήκες**

— περιγραφή των χρησιμοποιηθεισών διαδικασιών και των πειραματικών συνθηκών

— περιγραφή των μεθόδων αναλύσεως και ανιχνεύσεως.

3.1.3. **Αποτελέσματα**

— Αποτελέσματα διαλυτότητας εκχυλισιμότητας σε mg/1· επιμέρους και μέσες τιμές για δοκιμές εκχυλίσεως στα διάφορη διαλύματα, ξεχωριστά για την περιεκτικότητα σε πολυμερές και προσμείξεις. πρόσθετα κ.λπ.

— Αποτελέσματα διαλυτότητας εκχυλισιμότητας σε mg/g πολυμερούς

— Τιμές TOC των υδατικών εκχυλισμάτων, βάρος του διαλελυμένου σώματος και υπολογιζόμενα ποσοστά, εφόσον μετρήθηκαν

— Το pH κάθε δείγματος

— Πληροφορίες για τις τιμές των λευκών δειγμάτων

— Όπου απαιτείται, αναφορές στη χημική σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας, τόσο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής όσο και κατά τη διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας

— Κάθε πληροφορία που έχει σημασία για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

Α.21. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ (ΥΓΡΑ)

I. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδο¦ δοκιμής σχεδιάστηκε για τη μέτρηση της εν δυνάμει ικανότητας μίας υγρής ουσίας *να αυξήσει* την ταχύτητα καύσης ή την ένταση καύσης μιας καύσιμης ουσίας ή να σχηματίσει μείγμα με μια καύσιμη ουσία το οποίο να αναφλέγεται αυθόρμητα. Όταν οι δύο ουσίες αναμειχθούν επισταμένως. Βασίζεται στη δοκιμή των ΗΕ για τα οξειδωτικά υγρά (1) και είναι ισοδύναμη με αυτή. Ωστόσο, δεδομένου ότι η παρούσα μέθοδος Α-21 έχει σχεδιαστεί πρωταρχικώς για την εκπλήρωση των απαιτήσεων της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ, απαιτείται σύγκριση με μία μόνον ουσία αναφοράς. Μπορεί να είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθεί δοκιμή και σύγκριση και με άλλες ουσίες αναφοράς, όταν τα αποτελέσματα της δοκιμής προβλέπεται να χρησιμοποιηθούν και για άλλους σκοπούς. ([1])

Η παρούσα δοκιμή δεν εφαρμόζεται σε στερεά, αέρια, εκρηκτικές ή λίαν εύφλεκτες ουσίες ή οργανικά υπεροξείδια.

Χρήσιμα είναι, πριν από την εκτέλεση της παρούσας δοκιμής, να έχουμε προκαταρκτικές πληροφορίες για τυχόν εν δυνάμει εκρηκτικές ιδιότητες της ουσίας.

Η παρούσα δοκιμή δεν εφαρμόζεται σε στερεά, αέρια, εκρηκτικές ή λίαν εύφλεκτες ουσίες ή οργανικά υπεροξείδια.

Η παρούσα δοκιμή δεν χρειάζεται να εκτελείται όταν υπάρχουν ήδη διαθέσιμα αποτελέσματα για την υπό δοκιμή ουσία από τη δοκιμή των ΗΕ για τα οξειδωτικά υγρά (1).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Μέσος χρόνος αύξησης της πιέσεως είναι ο μέσος ορός των μετρούμενων χρόνων σε ένα υπό δοκιμή μείγμα για την αύξηση της πίεσης από 690 kPa σε 2 070 kPa πάνω από την ατμοσφαιρική πίεση.

1.3. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα 65 % w/w) νιτρικού οξέος (αναλυτικής καθαρότητας). ([2])

([1]) Όπως, για παράδειγμα, στα πλαίσια των κανονισμών του ΟΗΕ για τις μεταφορές.
([2]) Το οξύ θα πρέπει να τιτλοδοτείται πριν από τη δοκιμή για να επιβεβαιώνεται η συγκέντρωσή του.

▼B

Προαιρετικώς, εάν ο εκτελών το πείραμα προβλέπει ότι τα αποτελέσματα της παρούσας δοκιμής μπορεί ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν και για άλλους σκοπούς, ([1]) μπορεί να είναι σκόπιμη η δοκιμασία και έναντι άλλων ουσιών αναφοράς. ([2])

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Το προς δοκιμή υγρό μειγνύεται σε αναλογία 1 προς 1 κατά βάρος, με ίνες κυτταρίνης και εισάγεται σε δοχείο πιέσεως. Εάν κατά τη διάρκεια *της* μείξεως ή της πλήρωσης επέλθει αυθόρμητη ανάφλεξη, δεν χρειάζεται περαιτέρω δοκιμασία.

Εάν δεν επέλθει αυθόρμητη ανάφλεξη, τότε εκτελείται η πλήρης δοκιμή. Το μείγμα θερμαίνεται σε δοχείο πιέσεως και προσδιορίζεται ο μέσος χρόνος που απαιτείται για να αυξηθεί η πίεση από 690 kPa σε 2 070 kPa πάνω από την ατμοσφαιρική. Η τιμή συγκρίνεται με το μέσο χρόνο αύξησης της πίεσης για μείγμα 1:1 της ή των ουσιών αναφοράς και κυτταρίνης.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Σε μια σειρά πέντε δοκιμών για μια ουσία, κανένα αποτέλεσμα δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 30 % από τον αριθμητικό μέσο. Αποτελέσματα που διαφέρουν περισσότερο του 30 % από τον μέσον όρο θα πρέπει να απορρίπτονται, η διαδικασία μείξεως και πληρώσεως να βελτιώνεται και η δοκιμασία να επαναλαμβάνεται.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Παρασκευή**

1.6.1.1. *Καύσιμη ουσία*

Ως καύσιμο υλικό χρησιμοποιείται ξηρά, ινώδης κυτταρίνη με μήκος ινών μεταξύ 50 και 250 μm και μέση διάμετρο 25 μm. ([3]) Ξηραίνεται μέχρι σταθερού βάρους σε στιβάδα πάχους το πολύ 25 mm στους 105 °C για 4 ώρες και φυλάσσεται σε ξηραντήρα, με ξηραντικό, μέχρι να κρυώσει και να χρησιμοποιηθεί. Η περιεκτικότητα σε υγρασία της αποξηραμένης κυτταρίνης θα πρέπει να είναι κάτω του 0,5 % επί ξηράς μάζας ([4]). Εάν είναι ανάγκη, ο χρόνος ξήρανσης θα πρέπει να παρατείνεται μέχρι να επιτευχθεί το εν λόγω ποσοστό ([5]). Καθ' όλη τη δοκιμή πρέπει να χρησιμοποιείται η ίδια παρτίδα κυτταρίνης.

([1]) Όπως, για παράδειγμα, στα πλαίσια των κανονισμών του ΟΗΕ για τις μεταφορές.
([2]) Π.χ.: στην παραπομπή χρησιμοποιείται 50% (w/w) υπερχλωρικό οξύ και 40 % (w/w) χλωρικό νάτριο.
([3]) Π.χ. σκόνη κυτταρίνης CF 11 για στήλη χρωματογραφίας Whatman, κατάλογος αριθ. 4021 050.
([4]) Επιβεβαιούμενη με π.χ. τιτλοδότηση Karl-Fisher.
([5]) Εναλλακτικώς, το εν λόγω ποσοστό υγρασίας μπορεί επίσης να επιτευχθεί με π.χ. θέρμανση στους 105 °C υπό κενό για 24 ώρες.

▼B

1.6.1.2. *Εξοπλισμός*

1.6.1.2.1. Δοχείο πιέσεως

Απαιτείται δοχείο πιέσεως. Το δοχείο είναι χαλύβδινο κυλινδρικό δοχείο πιέσεως με μήκος 89 mm και εξωτερική διάμετρο 60 mm (βλέπε εικόνα 1). Εξ απεναντίας στο δοχείο υπάρχουν χαραγμένες δύο έδρες (με αποτέλεσμα τη μείωση της διατομής του δοχείου στα 50 mm) για να διευκολύνεται το πιάσιμο κατά την προσαρμογή του βύσματος πυροδότησης και του βύσματος της οπής εξαέρωσης. Το δοχείο, το οποίο φέρει οπή διαμέτρου 20 mm είναι αμβλυμμένο εσωτερικώς σε κάθε άκρο μέχρι βάθους 19 mm και σπειροτομημένο ώστε να δέχεται σωλήνα 1 (British Standard Pipe — BSP) ή αναλόγου κατά το μετρικό σύστημα διαμετρήματος. Στην καμπύλη επιφάνεια του δοχείου πιέσεως σε απόσταση 35 mm από το ένα άκρο και υπό γωνία 90 º σε σχέση με τις χαραγμένες έδρες βιδώνεται ένας απαγωγός πιέσεως ο οποίος έχει τη μορφή πλευρικού βραχίονα. Η εσοχή για την υποδοχή του έχει βάθος 12 mm και είναι σπειροτομημένη ώστε να δέχεται το σπείρωμα διαμετρήματος ½ ίντσας BSP (ή ισοδυνάμου διαμετρήματος στο μετρικό σύστημα) του άκρου του πλευρικού βραχίονα. Εάν είναι αναγκαίο προσαρμόζεται ένα αδρανές στεγανωτικό για διασφάλιση της αεροστεγανότητας. Ο πλευρικός βραχίονας εκτείνεται σε απόσταση 55 mm από το σώμα του δοχείου και φέρει οπή 6 mm. Το άκρο του πλευρικού βραχίονα είναι αμβλυμένο και σπειροτομημένο ώστε να δέχεται μορφοτροπέα πιέσεως τύπου διαφράγματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε διάταξη μέτρησης της πιέσεως, υπό την προϋπόθεση ότι δεν επηρεάζεται από τα θερμά αέρια ή από τα προϊόντα αποσύνθεσης και μπορεί να ανταποκριθεί σε ταχύτητες αύξησης της πίεσης 690-2 070 kPa μέσα σε 5 ms.

Το απώτερο από τον πλευρικό βραχίονα άκρο του δοχείου πιέσεως κλείνει με ένα βύσμα πυροδότησης εφοδιασμένο με δύο ηλεκτρόδια, το ένα μονωμένο και το άλλο γειωμένο στο σώμα του βύσματος. Το άλλο άκρο του δοχείου πιέσεως σφραγίζεται με ένα διαρρηγνυόμενο δίσκο (πίεση διαρρήξεως περίπου 2 200 kPa), ο οποίος κρατιέται στη θέση του με ένα βύσμα συγκράτησης που φέρει οπή 20 mm. Εάν είναι αναγκαίο για το βύσμα πυροδότησης χρησιμοποιείται και ένα αδρανές στεγανωτικό για να διασφαλίζεται το αεροστεγές του δοχείου. Κατά τη διάρκεια της χρήσης το όλο σύστημα κρατιέται στη σωστή θέση με έναν υποστάτη (εικόνα 2). Αυτός συνήθως αποτελείται από μια πλάκα από μαλακό χάλυβα διαστάσεων 235 × 184 × 6 mm, που χρησιμεύει ως βάση και από ένα ευθύγραμμο στέλεχος μήκους 185 mm τετραγωνικής κοίλης διατομής (S.H.S.) 70 × 70 × 4 mm.

Στο ένα άκρο του ευθύγραμμου στελέχους S.H.S. από κάθε μία από τις δύο εξ απεναντίας πλευρές, είναι αποκομμένο ένα τμήμα έτσι ώστε να δημιουργείται μια κατασκευή με δύο επίπεδα πλευρικώς σκέλη, πάνω από τα οποία υπάρχει ένα άθικτο κυτιοειδές τμήμα μήκους 86 mm. Τα άκρα των επίπεδων πλευρών είναι κομμένα κατά τρόπον ώστε ο σωλήνας να σχηματίζει γωνία 60º ως προς το οριζόντιο επίπεδο όταν έχει συγκολληθεί στην επίπεδη βάση. Σε μια πλευρά του πάνω άκρου της βάσης είναι χαραγμένη μια εγκοπή πλάτους 22 mm × 46 mm βάθος, έτσι ώστε όταν το σύστημα του δοχείου πιέσεως αρχίζει να κατεβαίνει, προηγουμένου του άκρου με το βύσμα πυροδότησης, προς το κυτιοειδές υποστήριγμα, ο πλευρικός βραχίονας να κάθεται στην εγκοπή. Στην κάτω εσωτερική επιφάνεια του κυτιόμορφου τμήματος υπάρχει συγκολλημένο ένα κομμάτι χάλυβα 30 mm πλάτους και 6 mm πάχους το οποίο δρα ως διαχωριστικό. Για τη συγκράτηση του δοχείου πιέσεως σταθερά στη θέση του, χρησιμοποιούνται δύο πεταλούδες 7 mm, ευρισκόμενες στην αντίθετη πλευρά. Στις πλευρές που καταλήγουν στη βάση του κυτιοειδούς τμήματος, είναι συγκολλημμένες δύο λωρίδες πλάτους 12 mm από χάλυβα πάχους 6 mm, που στηρίζουν το δοχείο πιέσεως από κάτω.

▼B

1.6.1.2.2 Σύστημα ανάφλεξης

Το σύστημα ανάφλεξης αποτελείται από σύρμα Ni/Cr μήκους 25 cm με διάμετρο 0,6 mm και ειδική αντίσταση 3,85 ohm/m. Το σύρμα είναι περιελιγμένο υπό μορφή πηνίου σε κυλινδρική ράβδο διαμέτρου 5 mm και συνδεδεμένο με τα ηλεκτρόδια του βύσματος πυροδότησης. Το πηνίο θα πρέπει να έχει μια από τις μορφές που εμφαίνονται στην εικόνα 3. Η απόσταση μεταξύ τον πυθμένα του δοχείου και της κάτω πλευράς του πηνίου ανάφλεξης θα πρέπει νια είναι 20 mm. Εάν δεν υπάρχει δυνατότητα προσαρμογής των ηλεκτροδίων τα άκρα του σύρματος ανάφλεξης μεταξύ του πηνίου και του πυθμένα του δοχείου θα πρέπει να μονώνονται με κεραμικό περίβλημα. Το σύρμα θερμαίνεται με σταθερή παροχή ρεύματος τουλάχιστον 10 A.

1.6.2 **Διεξαγωγή της δοκιμής** ([1])

Η διάταξη σε πλήρη συναρμολόγηση με τον μορφοτροπέα πιέσεως και το σύστημα θερμάνσεως αλλά χωρίς το διαρρηγνυόμενο δίσκο, στηρίζεται με το άκρο που φέρει το βύσμα πυροδότησης προς τα κάτω. 2,5 g του προς δοκιμή υγρού μειγνύονται με 2,5*g* ξηρής κυτταρίνης σε δοχείο ζέσεως χρησιμοποιώντας γυάλινη ράβδο ανάδευσης ([2]). Για ασφάλεια, η μείξη θα πρέπει va γίνεται τοποθετώντας ένα προστατευτικό θώρακα μεταξύ χειριστή και μείγματος. Εάν το μείγμα αναφλέγει κατά τη διάρκεια της μείξης ή της πλήρωσης, δεν χρειάζεται περαιτέρω δοκιμασία. Το μείγμα προστίθεται στο δοχείο πιέσεως, σε μικρές ποσότητες, προσέχοντας ώστε το μείγμα *να* σωρεύεται γύρω από το πηνίο ανάφλεξης και να είναι σε καλή επαφή με αυτό. Είναι σημαντικό το πηνίο να μην παραμορφώνεται κατά τη διάρκεια της συσσώρευσης, καθώς κάτι τέτοιο μπορεί να, οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα ([3]). Ο διαρρηγνυόμενος δίσκος τοποθετείται στη θέση του και το βύσμα συγκράτησης βιδώνεται σφικτά. Το γεμάτο δοχείο μεταφέρεται στον υποστάτη για πυροδότηση, με *το* δίσκο από την πάνω πλευρά, ο οποίος υποστάτης θα πρέπει να βρίσκεται μέσα σε κατάλληλο θωρακισμένο αεριοαπαγωγό ή στοιχείο πυροδότησης. Η παροχή ρεύματος συνδέεται με τους εξωτερικούς ακροδέκτες του βύσματος πυροδότησης και εφαρμόζεται ρεύμα 10 A. Το χρονικό διάστημα μεταξύ της έναρξης της μείξεως και της έναρξης παροχής ρεύματος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 10 λεπτά.

Το παρεχόμενο από τον μορφοτροπέα πιέσεως σήμα καταγράφεται με κατάλληλο σύστημα το οποίο έχει τη δυνατότητα εκτίμησης και καταγραφής της λαμβανομένης εικόνας της πιέσεως συναρτήσει του χρόνου (π.χ. καταγραφέας μεταβατικών καταστάσεων συνδεδεμένος με καταγραφικό χαρτί). Το μείγμα θερμαίνεται μέχρι διαρραγής του δίσκου ή για διάστημα τουλάχιστον 60 s. Εάν ο δίσκος δεν διαρραγεί, το μείγμα θα πρέπει να αφήνεται να ψυχθεί πριν αποσυναρμολογηθεί προσεκτικά η συσκευή, λαμβάνοντας πρόνοια για το ενδεχόμενο να επέλθει αύξηση της πιέσεως. Εκτελούνται πέντε δοκιμές με την υπό δοκιμή ουσία και την ή τις ουσίες αναφοράς. Σημειώνεται ο χρόνος που απαιτείται για την αύξηση της πιέσεως από 690 kPa σε 2 070 kPa πάνω από την ατμοσφαιρική. Υπολογίζεται ο μέσος χρόνος αύξησης της πιέσεως.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, ουσίες μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση πιέσεως (πολύ υψηλή ή πολύ χαμηλή) προκαλούμενη από χημικές αντιδράσεις μη χαρακτηριστικές των οξειδωτικών ιδιοτήτων της ουσίας. Στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να είναι αναγκαίο να επαναληφθεί η δοκιμή με μια αδρανή ουσία, *π.χ.* γη διατόμων (kieselguhr), *αντί* κυτταρίνης για να διευκρινιστεί το είδος της αντίδρασης.

([1]) Μείγματα οξειδωτικών με κυτταρίνη πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εν δυνάμει εκρηκτικά και ο χειρισμός τους να γίνεται με τη δέουσα προσοχή.

([2]) Στην πράξη, αυτό μπορεί να γίνεται παρασκευάζοντας μείγμα 1:1 του προς δοκιμή υγρού και κυτταρίνης σε μεγαλύτερη ποσότητα από την απαιτούμενη για τη δοκιμή και μεταφέροντας 5 ± 0,1 g στο δοχείο πιέσεως. Το μείγμα πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένο για κάβε δοκιμή.

([3]) Ιδιαίτερα, η επαφή μεταξύ των προσκείμενων σπειρών του πηνίου πρέπει να αποφεύγεται.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Χρόνοι αύξησης πιέσεως τόσο για την υπό δοκιμή ουσία, όσο και για την ή τις ουσίες αναφοράς. Χρόνοι αύξησης πιέσεως για τις δοκιμές με αδρανή ουσία, εφόσον γίνουν.

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπολογίζονται οι μέσοι χρόνοι αύξησης πιέσεως τόσο για την υπό δοκιμή, όσο και για την ή τις ουσίες αναφοράς.

Υπολογίζεται ο μέσος χρόνος αύξησης πιέσεως για τις δοκιμές με αδρανή ουσία (εφόσον γίνουν).

Ορισμένα παραδείγματα αποτελεσμάτων εμφαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Παραδείγματα αποτελεσμάτων (α)

Ουσία (β)	Μέσος χρόνος αύξησης πιέσεως για μείγμα 1:1 μι κυτταρίνη (ms)
Διχρωμικό αμμώνιο, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	20 800
Νιτρικό ασβέστιο, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	6 700
Νιτρικός σίδηρος III, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	4 133
Υπερχλωρικό λίθιο, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	1 686
Υπερχλωρικό μαγνήσιο, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	777
Νιτρικό νικέλιο, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	6 250
Νιτρικό οξύ 65 %	4 767 (γ)
Υπερχλωρικό οξύ, 50 %	121 (γ)
Υπερχλωρικό οξύ, 55 %	59
Νιτρικό κάλιο, 30 % υδατικό διάλυμα	26 690
Νιτρικός άργυρος, κορεσμένο υδατικό διάλυμα	(δ)
Χλωρικό νάτριο 40 % υδατικό διάλυμα	2 555 (γ)
Νιτρικό νάτριο, 45 % υδατικό διάλυμα	4 133
Αδρανής ουσία	
Νερό:κυτταρίνη	(γ)

(α) Βλέπε παραπομπή (1) για ταξινόμηση βάσει του σχήματος των ΗΕ για τις μεταφορές.
(β) Τα κορεσμένα διαλύματα θα πρέπει να παρασκευάζονται στους 20 °C.
(γ) Μέγιστη τιμή από διεργαστηριακές συγκριτικές δοκιμές.
(δ) Μέγιστη πίεση 2 070 kPa μη επιτευχθείσα.

▼B

3. **ΕΚΘΕΣΗ**

3.1 ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

— η ταυτότητα, η σύσταση, η καθαρότητα, κ.λπ. της υπό δοκιμή ουσίας,

— η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας,

— η διαδικασία ξήρανσης της χρησιμοποιούμενης κυτταρίνης,

— η υγρασία της χρησιμοποιούμενης κυτταρίνης,

— τα αποτελέσματα των μετρήσεων,

— τα αποτελέσματα δοκιμών με αδρανή ουσία εάν υπάρχουν,

— οι υπολογισθέντες μέσοι χρόνοι αύξησης της πίεσης,

— τυχόν παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο και οι λόγοι που τις επέβαλαν,

— κάθε πρόσθετη πληροφορία ή παρατήρηση σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ([1])

Τα αποτελέσματα δοκιμής αξιολογούνται με βάση:

α) το εάν το μείγμα της υπό δοκιμή ουσίας και της κυτταρίνης αναφλέγεται αυθόρμητα, και

β) τη σύγκριση του μέσου χρόνου που χρειάζεται για την αύξηση της πιέσεως από 690 kPa σε 2 070 kPa με εκείνον της ή των ουσιών αναφοράς.

Οι υγρές ουσίες πρέπει να θεωρούνται ως οξειδωτικές όταν:

α) μείγμα 1:1, κατά βάρος, της ουσίας και της κυτταρίνης αναφλέγεται αυθόρμητα, ή

β) μείγμα 1:1 κατά βάρος της ουσίας και της κυτταρίνης εμφανίζει μέσο χρόνο αύξησης πιέσεως μικρότερο ή ίσο με το μέσο χρόνο αύξησης πιέσεως μείγματος 1:1 κατά βάρος υδατικού διαλύματος 65 % (w/w) νιτρικού οξέος και κυτταρίνης.

Για την αποφυγή εσφαλμένου θετικού αποτελέσματος εάν είναι αναγκαίο κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη και τα αποτελέσματα από δοκιμή της ουσίας με αδρανές υλικό.

([1]) Βλέπε παραπομπή 1 για ερμηνεία των αποτελεσμάτων βάσει των κανονισμών των ΗΕ για τις μεταφορές με χρήση διάφορων ουσιών αναφοράς.

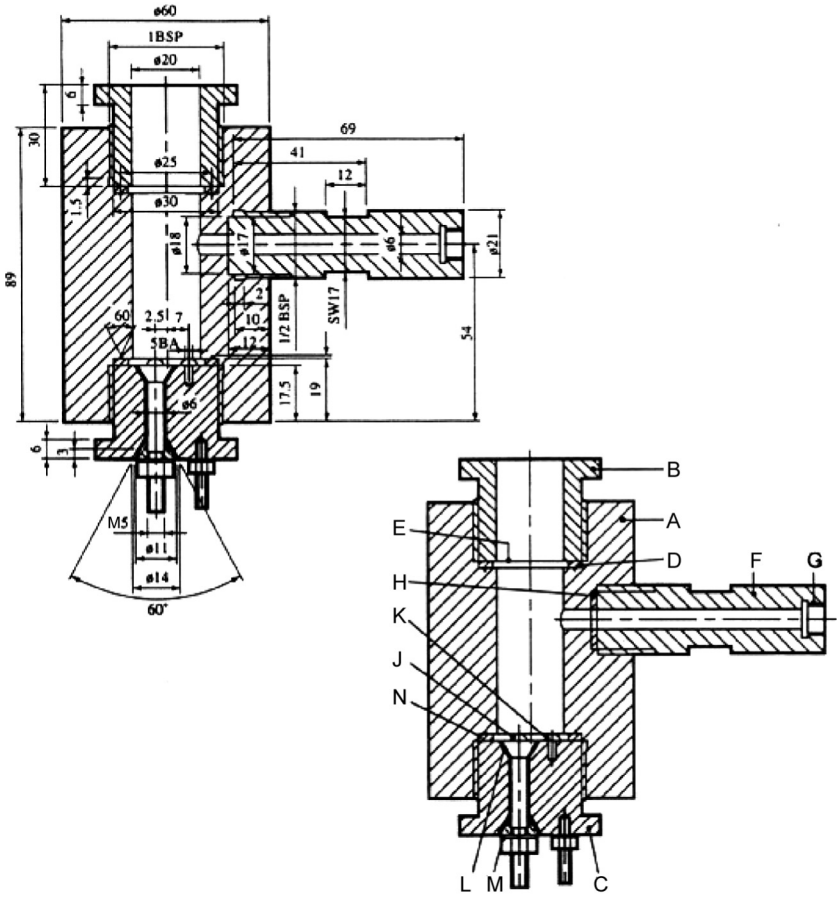
▼B

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria, 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342, Test 0.2: Test for oxidizing liquids.

Εικόνα 1

Δοχείο πίεσης



(A) Σώμα δοχείου πιέσεως

(B) Βύσμα συγκράτησης δίσκου

(C) Βύσμα πυροδότησης

(D) Ροδέλα μαλακού μολύβδου

(E) Διαρρηγνυόμενος δίσκος

(F) Πλευρικός βραχίονας

(G) Κεφαλή μορφοτροπέα πιέσεως

(H) Ροδέλα

(J) Μονωμένο ηλεκτρόδιο

(K) Γειωμένο ηλεκτρόδιο

(L) Μόνωση

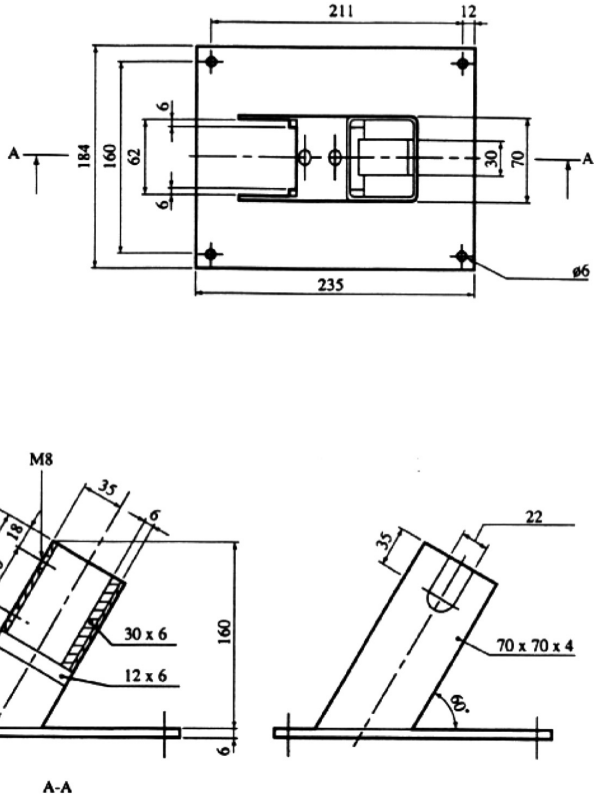
(M) Χαλύβδινος κώνος

(N) Χαραγή οτρέβλωσης ροδέλας

▼B

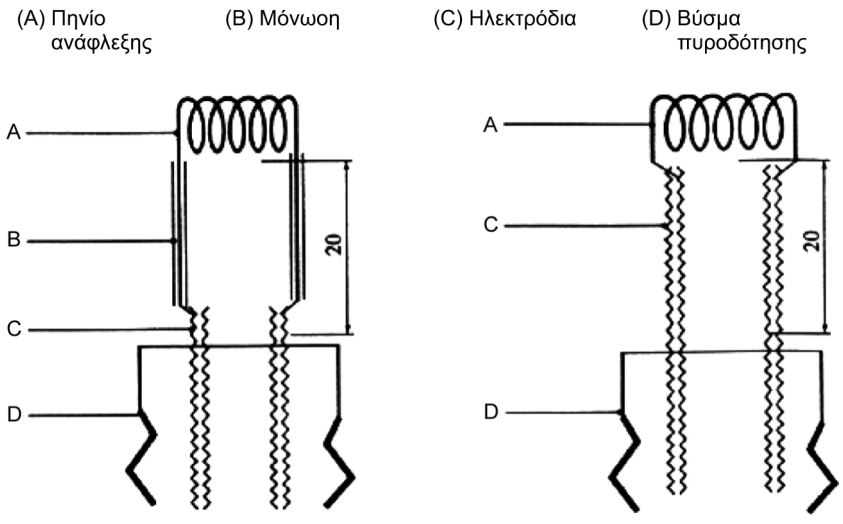
Εικόνα 2

Υποστάτης



Εικόνα 3

Σύστημα ανάφλεξης



Σημείωση: Οποιοδήποτε από αυτά τα δύο συστήματα μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

▼M1

Α.22. ΣΤΑΘΜΙΣΜΕΝΟΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΜΗΚΟΣ, ΓΕΩΜΕΤΡΙΚΟΣ ΜΕΣΟΣ ΤΩΝ ΔΙΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΙΝΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα μέθοδο περιγράφεται διαδικασία για τη μέτρηση του σταθμισμένου ως προς το μήκος, γεωμετρικού μέσου των διαμέτρων (σΜΓΜΔ) τεχνητών ορυκτών ινών (TOPI) χύμα. Δεδομένου ότι υπάρχει πιθανότητα 95 % να περικλείεται η ΣΜΓΜΔ του πληθυσμού εντός των ορίων εμπιστοσύνης 95 % (σΜΓΜΔ ± [2 × Τυπικό σφάλμα]) του δείγματος, η αναφερόμενη τιμή (η τιμή που προκύπτει από τη δοκιμή) είναι το κατώτερο όριο εμπιστοσύνης του δείγματος (δηλαδή ΣΜΓΜΔ — [2 × Τυπικό σφάλμα]). Η μέθοδος βασίζεται σε επικαιροποίηση (Ιούνιος 1994) ενός σχεδίου διαδικασίας για τη βιομηχανία, της βρετανικής Υπηρεσίας Υγείας και Ασφάλειας στην Εργασία (HSE), το οποίο εγκρίθηκε σε σύσκεψη της ECFIA (Ευρωπαϊκή Ένωση Βιομηχανιών Κεραμικών Ινών) και της HSE στο Chester στις 26.9.1993 και εκπονήθηκε για μια δεύτερη διεργαστηριακή δοκιμή, της οποίας τα αποτελέσματα ελήφθησαν υπόψη (1, 2). Η εν λόγω μέθοδος μετρήσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό της διαμέτρου των ινών σε ουσίες ή προϊόντα χύμα που περιέχουν TOPI, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι πυρίμαχες κεραμικές ίνες, οι τεχνητές υαλώδεις ίνες, οι κρυσταλλικές και πολυκρυσταλλικές ίνες.

Η στάθμιση ως προς το μήκος είναι ένας τρόπος αντιστάθμισης της επίδρασης που έχει στην κατανομή των διαμέτρων που προκύπτει από τη η θραύση των μεγάλου μήκους ινών κατά τη δειγματοληψία ή το χειρισμό του υλικού. Για τη μέτρηση της κατανομής μεγέθους των διαμέτρων των TOPI χρησιμοποιείται γεωμετρική στατιστική (γεωμετρικός μέσος), επειδή οι εν λόγω διάμετροι εμφανίζουν συνήθως κατανομές μεγέθους που προσεγγίζουν το λογάριθμο της κανονικής κατανομής.

Η μέτρηση και του μήκους, και της διαμέτρου είναι και επίπονη και χρονοβόρος, αλλά εάν μετρηθούν μόνον οι ίνες που εφάπτονται με μια απειροστού πάχους γραμμή σε ένα οπτικό πεδίο ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM), τότε η πιθανότητα επιλογής μιας δεδομένης ίνας είναι ανάλογη με το μήκος της. Δεδομένου ότι, με τον τρόπο αυτό, το μήκος συνεκτιμάται στους υπολογισμούς στάθμισης ως προς το μήκος, η μόνη μέτρηση που απαιτείται είναι της διαμέτρου, οπότε είναι δυνατόν να υπολογιστεί η τιμή ΣΜΓΜΔ-(2 × Τυπικό σφάλμα), όπως περιγράφεται.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Σωματίδιο: σώμα με λόγο μήκους προς πλάτος μικρότερο από 3:1.

Ίνα: σώμα με λόγο μήκους προς πλάτος (λόγος όψεως) τουλάχιστον 3:1.

1.3. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η μέθοδος έχει σχεδιαστεί για την εξέταση κατανομών διαμέτρου στις περιπτώσεις όπου η διάμεσος των διαμέτρων κυμαίνεται από 0,5 μm έως 6 μm. Μεγαλύτερες διάμετροι μπορούν να μετρηθούν με μικρότερη μεγέθυνση του SEM, ενώ η ισχύς της μεθόδου περιορίζεται για τις κατανομές λεπτότερων ινών. Εάν η διάμεσος των διαμέτρων είναι μικρότερη από 0,5 μm, συνιστάται η μέτρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM).

▼M1

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Από τον μανδύα ινών ή από ελεύθερες ίνες χύμα λαμβάνονται ορισμένα αντιπροσωπευτικά δείγματα πυρήνα. Το μήκος των ινών χύμα ελαττώνεται με διαδικασία σύνθλιψης και σχηματίζεται κολλοειδές διάλυμα αντιπροσωπευτικού μερικού δείγματος σε νερό. Λαμβάνονται κατάλληλες ποσότητες, διηθούνται με ηθμό από πολυανθρακικό πολυμερές με μέγεθος πόρων 0,2 μm και παρασκευάζεται δοκίμιο για εξέταση με τεχνικές ηλεκτρονικού μικροσκόπιου σάρωσης (SEM). Οι διάμετροι των ινών μετριούνται με μεγέθυνση οθόνης ×10 000 ή μεγαλύτερη ([1]) με χρήση μεθόδου τομής με οριζόντια γραμμή για την αμερόληπτη εκτίμηση της διαμέσου των διαμέτρων. Υπολογίζεται το κατώτερο διάστημα εμπιστοσύνης 95 % (με βάση μονόπλευρη δοκιμή) για να εκτιμηθεί η χαμηλότερη τιμή του γεωμετρικού μέσου των διαμέτρων των ινών του υλικού.

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.5.1. **Ασφάλεια/Προφυλάξεις**

Θα πρέπει να ελαχιστοποιείται η έκθεση ατόμων σε αερόφερτες ίνες και να χρησιμοποιείται απαγωγός εστία ή συσκευή με χειριστήρια (glove box) για τις εργασίες με ξηρές ίνες. Θα πρέπει να παρακολουθείται κατά περιόδους η έκθεση των ατόμων για να διαπιστώνεται η αποτελεσματικότητα των μεθόδων ελέγχου. Οι εργασίες με TOPI θα πρέπει να εκτελούνται με γάντια μιας χρήσης για τον περιορισμό του ερεθισμού του δέρματος και την αποτροπή της έμμεσης μόλυνσης.

1.5.2. **Όργανα/έξοπλισμός**

— Πιεστήριο (πρέσα) και μήτρες (ικανό να αποδίδει 10 MPa)

— Τριχοειδείς πορώδεις ηθμοί από πολυανθρακικό πολυμερές με μέγεθος πόρων 0,2 μm (διάμετρος 25 mm)

— Διηθητική μεμβράνη από εστέρα κυτταρίνης με μέγεθος πόρων 5 μm, προοριζόμενη να χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτικός ηθμός

— Γυάλινη συσκευή διήθησης (ή συστήματα διήθησης μίας χρήσης), ικανή να δέχεται ηθμούς διαμέτρου 25 mm (π.χ. γυάλινο kit μικροανάλυσης Millipore, τύπος XX10 025 00)

— Πρόσφατα απεσταγμένο νερό, που έχει διηθηθεί με ηθμό με μέγεθος πόρων 0,2 μm για την απαλλαγή του από μικροοργανισμούς

— Συσκευή εναπόθεσης υλικού με κονιορτοποίηση (sputter coater) με στόχο χρυσού ή χρυσού/παλλαδίου

— Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης με διακριτική ικανότητα 10 nm και ικανότητα λειτουργίας με μεγέθυνση × 10 000

— Διάφορα: σπαθίδες (σπάτουλες), λεπίδα νυστεριού τύπου 24, λαβίδες, σωλήνες SEM, κόλλα ή κολλητική ταινία άνθρακα, κολλοειδής άργυρος

— Καθετήρας υπερήχων ή επιτραπέζιο λουτρό υπερήχων

— Πυρηνολήπτης ή φελλοτρυπητήρας για τη λήψη δειγμάτων πυρήνα από μανδύες TOPI

([1]) Αυτή η τιμή μεγέθυνσης υποδεικνύεται για ίνες 3 μm, ενώ στην περίπτωση των ινών 6 μm μπορεί να ενδείκνυται περισσότερο η μεγέθυνση × 5 000.

▼**M1**

1.5.3. **Διαδικασία δοκιμής**

1.5.3.1. *Δειγματοληψία*

Για τους μανδύες και τα πιλήματα χρησιμοποιείται πυρηνολήπτης ή φελλοτρυπητήρας των 25 mm, προκειμένου να συλλεγούν δείγματα της ενεργού διατομής. Τα εν λόγω δείγματα θα πρέπει να είναι κατανεμημένα ισομερώς σε όλο το πλάτος ενός μικρού μήκους του μανδύα ή να λαμβάνονται από τυχαία σημεία, εάν είναι διαθέσιμα μεγάλα μήκη του μανδύα. Ο ίδιος εξοπλισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόσπαση τυχαίων δειγμάτων από ελεύθερες ίνες. Εφόσον είναι εφικτό, θα πρέπει να λαμβάνονται έξι δείγματα για να αντιπροσωπεύουν τις χωρικές διακυμάνσεις του χύμα υλικού.

Τα έξι δείγματα πυρήνα θα πρέπει να συνθλίβονται μέσα σε μήτρα διαμέτρου 50 mm με την άσκηση πίεσης 10 MPa. Το υλικό αναμιγνύεται με σπαθίδα, συμπιέζεται εκ νέου με 10 Mpa και, κατόπιν, απομακρύνεται από τη μήτρα και φυλάσσεται σε σφραγισμένη γυάλινη φιάλη.

1.5.3.2. *Παρασκευή δοκιμίου*

Εάν είναι απαραίτητο, το οργανικό συνδετικό μέσο μπορεί να αφαιρεθεί με θέρμανση των ινών σε κλίβανο στους 450 °C για μία ώρα περίπου.

Το δείγμα χωρίζεται σε μερίδια με αποκοπή τεταρτημορίων κύκλου (η εργασία αυτή θα πρέπει να εκτελείται σε απαγωγό εστία).

Με τη βοήθεια σπαθίδας, προστίθεται μια μικρή ποσότητα (< 0,5 g) δείγματος σε 100 ml πρόσφατα απεσταγμένου νερού, το οποίο έχει διηθηθεί με διηθητική μεμβράνη των 0,2 μm (μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές πηγές εξαιρετικά καθαρού νερού, εάν είναι αποδεδειγμένα ικανοποιητικές). Το δείγμα διασπείρεται πλήρως με τη βοήθεια καθετήρα υπερήχων, που λειτουργεί σε ισχύ 100 W και είναι ρυθμισμένος έτσι ώστε να επιτυγχάνει σπηλαίωση. (Εάν δεν διατίθεται καθετήρας, εφαρμόζεται η εξής μέθοδος: επανειλημμένη ανακίνηση και αναστροφή για 30 δευτερόλεπτα, τοποθέτηση σε επιτραπέζιο λουτρό υπερήχων για πέντε λεπτά και επανειλημμένη ανακίνηση και αναστροφή για 30 δευτερόλεπτα ακόμη).

Αμέσως μετά τη διασπορά των ινών, λαμβάνονται κατάλληλες ποσότητες (π.χ. τρεις ποσότητες 3, 6 και 10 ml) με σιφώνιο με ευρύ στόμιο (χωρητικότητας 2-5 ml).

Κάθε κατάλληλη ποσότητα διηθείται υπό κενό με ηθμό από πολυανθρακικό πολυμερές των 0,2 μm, τοποθετημένο μέσα σε διηθητική μεμβράνη από εστέρα κυτταρίνης με μέγεθος πόρων 5 μm, σε γυάλινη χοάνη διήθησης με κυλινδρικό υποδοχέα. Στη χοάνη θα πρέπει να φέρονται περίπου 5 ml διηθημένου απεσταγμένου νερού και η κατάλληλη ποσότητα να εισάγεται στο νερό με αργή αναρρόφηση, διατηρώντας το ρύγχος του σιφωνίου κάτω από το μηνίσκο. Το σιφώνιο και ο υποδοχέας πρέπει να εκπλύνονται σχολαστικά μετά την αναρρόφηση, δεδομένου ότι οι λεπτές ίνες τείνουν να συγκεντρώνονται στην επιφάνεια.

Ο ηθμός απομακρύνεται με προσοχή και χωρίζεται από τον ενισχυτικό ηθμό, πριν τοποθετηθεί σε δοχείο για να ξηρανθεί.

▼M1

Από το ίζημα της διήθησης αποκόπτεται με λεπίδα νυστεριού τύπου 24 ένα τμήμα που αντιστοιχεί σε ένα τέταρτο ή στο ήμισυ του ηθμού, με παλινδρομική κίνηση. Το κομμένο τμήμα στερεώνεται με προσοχή σε στήριγμα δοκιμίου (stub) του SEM με τη βοήθεια κολλητικής ταινίας άνθρακα ή κόλλας άνθρακα. Για τη βελτίωση της ηλεκτρικής επαφής στα άκρα του ηθμού και του στηρίγματος, θα πρέπει να τοποθετείται κολλοειδής άργυρος σε τρεις τουλάχιστον θέσεις. Αφού στεγνώσουν η κόλλα και ο κολλοειδής άργυρος, η επιφάνεια το ιζήματος επικαλύπτεται με ένα στρώμα χρυσού ή χρυσού/παλλαδίου πάχους περίπου 50 nm με την ειδική συσκευή.

1.5.3.3. *Βαθμονόμηση και λειτουργία του SEM*

1.5.3.3.1. Βαθμονόμηση

Η βαθμονόμηση του SEM θα πρέπει να ελέγχεται τουλάχιστον ανά εβδομάδα (θεωρητικά, καθημερινά) με πιστοποιημένο κάναβο βαθμονόμησης. Η βαθμονόμηση θα πρέπει να συγκρίνεται με πιστοποιημένο πρότυπο και εάν η μετρηθείσα τιμή (SEM) δεν περικλείεται εντός των ορίων ± 2 % της πιστοποιημένης τιμής, πρέπει να ρυθμίζεται το SEM και να επανελέγχεται η βαθμονόμηση.

Το SEM θα πρέπει να είναι ικανό να διακρίνει τουλάχιστον μια ελάχιστη ορατή διάμετρο 0,2 μm σε πραγματικό βασικό υλικό δείγματος με μεγέθυνση × 2 000.

1.5.3.3.2. Λειτουργία

Το SEM θα πρέπει να λειτουργεί με μεγέθυνση × 10 000 ([1]) σε συνθήκες που εξασφαλίζουν ικανοποιητική διακριτική ικανότητα με αποδεκτή εικόνα σε χαμηλές ταχύτητες σάρωσης της τάξεως, λόγου χάριν, των 5 δευτερολέπτων ανά πλαίσιο. Αν και οι απαιτήσεις λειτουργίας των διαφόρων SEM μπορεί να ποικίλλουν, για να επιτευχθεί γενικά η καλύτερη δυνατή ορατότητα και διακριτική ικανότητα, όταν εξετάζονται υλικά σχετικά μικρού ατομικού βάρους, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επιταχυντικά δυναμικά των 5-10 keV με ρύθμιση μικρής κηλίδας και μικρή απόσταση εργασίας. Κατά τη γραμμική όδευση θα πρέπει να χρησιμοποιείται κλίση 0^{o} για την ελαχιστοποίηση της επανεστίασης ή, εφόσον το SEM διαθέτει ευκεντρωμένο (eucentric) αντικειμενικό σύστημα, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ευκεντρωτική απόσταση εργασίας. Εάν το υλικό δεν περιέχει ίνες μικρής διαμέτρου και οι διάμετροι των ινών είναι μεγάλες (> 5 μm), μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερη μεγέθυνση.

1.5.3.4. *Προσδιορισμός του μεγέθους*

1.5.3.4.1. Εξέταση με μικρή μεγέθυνση για την αξιολόγηση του δοκιμίου

Το δοκίμιο θα πρέπει πρώτα να εξετάζεται με μικρή μεγέθυνση για να διαπιστωθεί αν έχουν σχηματιστεί τολύπες μεγάλων ινών και να εκτιμηθεί η πυκνότητα των ινών. Σε περίπτωση υπέρμετρου σχηματισμού τολυπών, συνιστάται η παρασκευή νέου δοκιμίου.

Για λόγους στατιστικής ακρίβειας, είναι απαραίτητη η μέτρηση ενός ελάχιστου αριθμού ινών και η μεγάλη πυκνότητα ινών μπορεί να φαίνεται επιθυμητή, δεδομένου ότι η εξέταση κενών πεδίων είναι χρονοβόρος και δεν εξυπηρετεί την ανάλυση. Εν τούτοις, η υπερφόρτωση του ηθμού δυσχεραίνει τη μέτρηση του συνόλου των μετρήσιμων ινών και ενέχει τον κίνδυνο να παραλειφθούν οι μικρές ίνες, επειδή μπορεί να σκιάζονται από τις μεγάλες.

([1]) Για τις ίνες 3 μm, βλέπε προηγούμενη υποσημείωση.

▼M1

Πυκνότητες μεγαλύτερες από 150 ίνες ανά χιλιοστόμετρο γραμμικής όδευσης ενδέχεται να έχουν ως αποτέλεσμα συστηματικού σφάλματος την υπερεκτίμηση της ΣΜΓΜΔ. Από την άλλη πλευρά, οι χαμηλές συγκεντρώσεις ινών αυξάνουν το χρόνο που απαιτείται για την ανάλυση· για το λόγο αυτό, συχνά είναι οικονομικά αποδοτικότερη η παρασκευή δοκιμίου με πυκνότητα ινών που να προσεγγίζει το άριστο αντί της εμμονής στη μέτρηση ιζημάτων χαμηλής συγκέντρωσης. Η βέλτιστη πυκνότητα ινών θα πρέπει να δίδει κατά μέσον όρο μία ή δύο μετρήσιμες ίνες ανά οπτικό πεδίο σε μεγέθυνση × 5 000. Ωστόσο, η βέλτιστη πυκνότητα εξαρτάται από το μέγεθος (διάμετρος) των ινών και, συνεπώς, είναι απαραίτητο να απευθυνθεί ο τεχνικός σε εμπειρογνώμονα, πριν κρίνει κατά πόσον η πυκνότητα ινών προσεγγίζει το άριστο.

1.5.3.4.2. Στάθμιση των διαμέτρων των ινών ως προς το μήκος

Μετριούνται μόνον οι ίνες που εφάπτονται (ή τέμνονται) με μια λεπτή (απειροστού πάχους) γραμμή, που χαράσσεται στην οθόνη του SEM. Για το λόγο αυτό, χαράσσεται οριζόντια (ή κάθετη) γραμμή, διερχόμενη από το κέντρο της οθόνης.

Εναλλακτική δυνατότητα είναι η τοποθέτηση ενός και μόνο σημείου στο κέντρο της οθόνης και η συνεχής σάρωση του ηθμού προς μία κατεύθυνση. Μετριέται και καταγράφεται η διάμετρος κάθε ίνας με λόγο όψεως μεγαλύτερο από 3:1, που εφάπτεται ή τέμνεται με το σημείο αυτό.

1.5.3.4.3. Προσδιορισμός του μεγέθους των ινών

Συνιστάται η μέτρηση τουλάχιστον 300 ινών. Κάθε ίνα μετριέται μόνο μία φορά στο σημείο τομής με τη γραμμή ή το σημείο που έχει χαραχθεί στην εικόνα (ή κοντά στο σημείο τομής, εάν τα άκρα της ίνας είναι σκοτεινά). Σε περίπτωση συνάντησης με ίνες που έχουν ανομοιόμορφες ενεργούς διατομές, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια μέτρηση αντιπροσωπευτική του μέσου όρου διαμέτρων των ινών. Θα πρέπει να ορίζεται με προσοχή το άκρο και να μετριέται η πιο σύντομη απόσταση ανάμεσα στα άκρα των ινών. Ο προσδιορισμός του μεγέθους μπορεί να εκτελείται απευθείας (on-line) ή μετά την εξέταση των ινών, σε αποθηκευμένες εικόνες ή φωτογραφίες. Συνιστάται η χρήση ημιαυτόματων συστημάτων μέτρησης εικόνων, τα οποία μεταφέρουν τα δεδομένα κατευθείαν σε λογιστικά φύλλα, επειδή με τον τρόπο αυτό εξοικονομείται χρόνος, εκλείπουν τα σφάλματα μεταγραφής και μπορούν να αυτοματοποιηθούν οι υπολογισμοί.

Τα άκρα των ινών μεγάλου μήκους θα πρέπει να ελέγχονται με μικρή μεγέθυνση για να εξακριβώνεται ότι δεν συστρέφονται με αποτέλεσμα να επανέρχονται στο οπτικό πεδίο μέτρησης και ότι μετριούνται μόνο μία φορά.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι διάμετροι των ινών συνήθως δεν εμφανίζουν κανονική κατανομή. Ωστόσο, είναι δυνατόν να ληφθεί μια κατανομή που προσεγγίζει την κανονική με λογαριθμική μετατροπή.

Υπολογίζονται ο αριθμητικός μέσος (μέση τιμή lnD) και η τυπική απόκλιση (SD_{lnD}) του νεπερίου λογαρίθμου των τιμών (lnD) διαμέτρου (D) των n ινών.

$$\text{mean } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Η τυπική απόκλιση διαιρούμενη δια της τετραγωνικής ρίζας του αριθμού των μετρήσεων (n) παρέχει το τυπικό σφάλμα (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Αφαιρώντας το διπλάσιο του τυπικού σφάλματος από τον αριθμητικό μέσο και αντικαθιστώντας την τιμή αυτή (μέσος όρος μείον το διπλάσιο του τυπικού σφάλματος) στην ακόλουθη εκθετική σχέση, προκύπτει ο γεωμετρικός μέσος μειωμένος κατά το διπλάσιο του γεωμετρικού τυπικού σφάλματος.

$$\Sigma\text{ΜΓΜΔ} - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

— την τιμή ΣΜΓΜΔ-2SE,

— κάθε διαφορά και ιδίως εκείνες που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει την επαναληπτικότητα ή την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, με κατάλληλη αιτιολόγηση.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division, 1994.

▼M4

Α.23 ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ (ΟΚΤΑΝΟΛΗ-1/ΝΕΡΟ): ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΑΡΓΗΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 123 του ΟΟΣΑ (2006). Με τη μέθοδο της αργής ανάδευσης έχουν προσδιοριστεί με ακρίβεια τιμές του συντελεστή κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού (P_{OW}) μέχρι λογαρίθμου του P_{OW} ίσου με 8,2 (1). Συνεπώς, αποτελεί κατάλληλη πειραματική προσέγγιση για τον άμεσο προσδιορισμό του P_{OW} εξαιρετικά υδρόφοβων ουσιών.

2. Άλλες μέθοδοι προσδιορισμού του συντελεστή κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού (P_{OW}) είναι η μέθοδος της «ανακινούμενης φιάλης» (2) και ο προσδιορισμός του P_{OW} από τη συμπεριφορά κατακράτησης σε χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης (3). Η μέθοδος της «ανακινούμενης φιάλης» είναι επιρρεπής σε τεχνητές ενδείξεις (artifacts) λόγω της μετακίνησης μικροσταγονιδίων οκτανόλης στην υδατική φάση. Όσο αυξάνονται οι τιμές P_{OW}, η παρουσία αυτών των σταγονιδίων στην υδατική φάση οδηγεί σε αυξανόμενη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στο νερό. Συνεπώς, η χρήση της περιορίζεται σε ουσίες με λογάριθμο του P_{OW} < 4. Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται σε αξιόπιστα δεδομένα απευθείας προσδιορισμένων τιμών P_{OW} για τη βαθμονόμηση της σχέσης μεταξύ της συμπεριφοράς κατακράτησης σε HPLC και των μετρούμενων τιμών P_{OW}. Για τον προσδιορισμό των συντελεστών κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού των ιονιζόμενων ουσιών ήταν διαθέσιμο ένα σχέδιο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ ([4]), το οποίο όμως δεν χρησιμοποιείται πλέον.

3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αναπτύχθηκε στις Κάτω Χώρες. Η ακρίβεια των περιγραφόμενων μεθόδων έχει επαληθευτεί και βελτιστοποιηθεί μέσω μελέτης επικύρωσης με κυκλική δοκιμή (ring-test) στην οποία συμμετείχαν 15 εργαστήρια (5).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

Σημασία και χρήση

4. Στην περίπτωση αδρανών οργανικών ουσιών, έχουν διαπιστωθεί εξαιρετικά σημαντικές σχέσεις μεταξύ των συντελεστών κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού (P_{OW}) και της βιοσυσσώρευσής τους στα ψάρια. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ο P_{OW} σχετίζεται με την ιχθυοτοξικότητα, καθώς και με τη ρόφηση χημικών ουσιών σε στερεά, π.χ. στο έδαφος και σε ιζήματα. Εκτεταμένη ανασκόπηση των σχέσεων παρουσιάζεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (6).

5. Έχει διαπιστωθεί ευρύ φάσμα σχέσεων μεταξύ του συντελεστή κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού και άλλων, σημαντικών για την περιβαλλοντική τοξικολογία και χημεία, ιδιοτήτων των ουσιών. Κατά συνέπεια, ο συντελεστής κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού έχει εξελιχθεί σε βασική παράμετρο της εκτίμησης της περιβαλλοντικής επικινδυνότητας των χημικών ουσιών, καθώς και της πρόβλεψης της πορείας τους στο περιβάλλον.

Πεδίο εφαρμογής

6. Το πείραμα αργής ανάδευσης θεωρείται ότι μειώνει τον σχηματισμό μικροσταγονιδίων από σταγονίδια οκτανόλης-1 στην υδατική φάση. Κατά συνέπεια, δεν υπερεκτιμάται η συγκέντρωση στο νερό λόγω σύνδεσης μορίων της ελεγχόμενης ουσίας με τα εν λόγω σταγονίδια. Ως εκ τούτου, η μέθοδος της αργής ανάδευσης είναι ιδιαιτέρως κατάλληλη για τον προσδιορισμό του P_{OW} ουσιών με αναμενόμενες τιμές λογαρίθμου του P_{OW} της τάξης του 5 ή υψηλότερες, για τις οποίες η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης (2) συχνά οδηγεί σε εσφαλμένα αποτελέσματα.

▼M4

ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

7. Ο συντελεστής κατανομής μιας ουσίας μεταξύ νερού και λιπόφιλου διαλύτη (οκτανόλη-1) χαρακτηρίζει την κατανομή της χημικής ουσίας μεταξύ των δύο φάσεων σε κατάσταση ισορροπίας. Ο συντελεστής κατανομής μεταξύ νερού και οκτανόλης-1 (P_{OW}) ορίζεται ως ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας της ελεγχόμενης ουσίας σε οκτανόλη-1 κορεσμένη με νερό (C_O) και σε νερό κορεσμένο με οκτανόλη-1 (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Δεδομένου ότι πρόκειται για λόγο συγκεντρώσεων, είναι αδιάστατο μέγεθος. Συνήθως δίδεται με τη μορφή δεκαδικού λογαρίθμου ($\log P_{OW}$). Ο P_{OW} εξαρτάται από τη θερμοκρασία και στα αναφερόμενα δεδομένα θα πρέπει να περιλαμβάνεται η θερμοκρασία μέτρησης.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

8. Για να προσδιοριστεί ο συντελεστής κατανομής, το νερό, η οκτανόλη-1 και η ελεγχόμενη ουσία εξισορροπούνται σε σταθερή θερμοκρασία. Στη συνέχεια, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας στις δύο φάσεις.

9. Οι πειραματικές δυσκολίες που σχετίζονται με τον σχηματισμό μικροσταγονιδίων κατά το πείραμα ανακινούμενης φιάλης μπορούν να μειωθούν στο προτεινόμενο πείραμα αργής ανάδευσης. Στο πείραμα αργής ανάδευσης, το νερό, η οκτανόλη-1 και η ελεγχόμενη ουσία φέρονται σε ισορροπία σε έναν θερμοστατούμενο αναδευόμενο αντιδραστήρα. Η ανταλλαγή μεταξύ των φάσεων επιταχύνεται με την ανάδευση. Η ανάδευση προκαλεί περιορισμένη τυρβώδη ροή που βελτιώνει την ανταλλαγή μεταξύ οκτανόλης-1 και νερού χωρίς να σχηματίζονται μικροσταγονίδια (1).

ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Δεδομένου ότι η παρουσία ουσιών πέραν της ελεγχόμενης ουσίας ενδέχεται να επηρεάσει τον συντελεστή δραστικότητας της ελεγχόμενης ουσίας, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή ως καθαρή ουσία. Για το πείραμα κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη καθαρότητα που είναι διαθέσιμη στο εμπόριο.

11. Η παρούσα μέθοδος εφαρμόζεται σε καθαρές ουσίες που δεν διίστανται ούτε συνδέονται και δεν εμφανίζουν σημαντική δραστικότητα στη μεσεπιφάνεια. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του λόγου κατανομής σε οκτανόλη-1/νερό τέτοιων ουσιών και μειγμάτων. Όταν η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για μείγματα, οι προσδιοριζόμενοι λόγοι κατανομής σε οκτανόλη-1/νερό εξαρτώνται από τη χημική σύνθεση του ελεγχόμενου μείγματος και τη σύνθεση του ηλεκτρολύτη που χρησιμοποιείται ως υδατική φάση. Εφόσον λαμβάνονται πρόσθετα μέτρα, η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται επίσης σε διιστάμενες ή συνδεόμενες ενώσεις (παράγραφος 12).

12. Εξαιτίας των πολλαπλών ισορροπιών σε νερό και οκτανόλη-1 που υπεισέρχονται στην κατανομή σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού διιστάμενων ουσιών, όπως οργανικών οξέων και φαινολών, οργανικών βάσεων και οργανομεταλλικών ουσιών, ο λόγος κατανομής σε οκτανόλη-1/νερό αποτελεί συμβατική (καταστατική) σταθερά, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμός από τη σύνθεση των ηλεκτρολυτών (7)(8). Ως εκ τούτου, για τον προσδιορισμό του λόγου κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού, θα πρέπει να ελέγχονται στο πείραμα το pH και η σύνθεση του ηλεκτρολύτη και να αναφέρονται. Οι εν λόγω λόγοι κατανομής πρέπει να αξιολογούνται με βάση την κρίση των ειδικών. Με τη βοήθεια της σταθεράς (των σταθερών) διάστασης, πρέπει να επιλέγονται κατάλληλες τιμές pH ώστε να προσδιορίζεται λόγος κατανομής για κάθε κατάσταση ιοντισμού. Κατά τη δοκιμή οργανομεταλλικών ενώσεων πρέπει να χρησιμοποιούνται μη συμπλεκτικά ρυθμιστικά διαλύματα (8). Λαμβανομένων υπόψη των υφιστάμενων γνώσεων στον τομέα της υδατικής χημείας (σταθερές συμπλοκοποίησης, σταθερές διάστασης), οι πειραματικές συνθήκες πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να μπορούν να εκτιμηθούν οι διαφορετικές μορφές της ελεγχόμενης ουσίας στην υδατική φάση. Η ιοντική ισχύς θα πρέπει να είναι η ίδια σε όλα τα πειράματα με τη χρήση ηλεκτρολύτη υποβάθρου.

▼M4

13. Ενδέχεται να ανακύψουν δυσκολίες κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής με ουσίες χαμηλής υδατοδιαλυτότητας ή υψηλού P_{OW}, διότι οι συγκεντρώσεις στο νερό είναι τόσο χαμηλές ώστε είναι δύσκολο να προσδιοριστούν με ακρίβεια. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει κατευθύνσεις για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

14. Τα χημικά αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικού βαθμού καθαρότητας ή υψηλότερου. Συνιστάται η χρήση μη ραδιοσημασμένων ελεγχόμενων ουσιών γνωστής χημικής σύνθεσης και, κατά προτίμηση, καθαρότητας τουλάχιστον 99 % ή ραδιοσημασμένων ελεγχόμενων ουσιών γνωστής χημικής σύνθεσης και ραδιοχημικής καθαρότητας. Στην περίπτωση των ιχνηθετών με μικρό χρόνο υποδιπλασιασμού, πρέπει να εφαρμόζονται διορθώσεις για τη διάσπαση. Στην περίπτωση των ραδιοσημασμένων ελεγχόμενων ουσιών, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ειδική για τη χημική ουσία αναλυτική μέθοδος, ώστε να εξασφαλίζεται ότι η μετρούμενη ραδιενέργεια σχετίζεται άμεσα με την ελεγχόμενη ουσία.

15. Ο λογάριθμος του P_{OW} μπορεί να εκτιμηθεί με τη χρήση είτε διαθέσιμου στο εμπόριο λογισμικού για την εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{OW} είτε του λόγου των διαλυτοτήτων στους δύο διαλύτες.

16. Πριν από την εκτέλεση πειράματος αργής ανάδευσης για τον προσδιορισμό του P_{OW}, θα πρέπει να είναι διαθέσιμες οι ακόλουθες πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία:

α) συντακτικός τύπος·

β) κατάλληλες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ουσίας στο νερό και σε οκτανόλη-1·

γ) σταθερά (σταθερές) διάστασης ιονιζόμενων ουσιών [κατευθυντήρια γραμμή 112 του ΟΟΣΑ (9)]·

δ) υδατοδιαλυτότητα (10)·

ε) αβιοτική υδρόλυση (11)·

στ) άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (12)·

ζ) τάση ατμών (13).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εξοπλισμός και συσκευές

17. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και ειδικότερα:

— μαγνητικοί αναδευτήρες και μαγνητικές ράβδοι ανάδευσης επενδυμένες με Teflon για την ανάδευση της υδατικής φάσης,

— όργανα ανάλυσης κατάλληλα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στα αναμενόμενα επίπεδα,

— δοχείο ανάδευσης με στρόφιγγα στον πυθμένα. Ανάλογα με την εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{OW} και το όριο ανίχνευσης (LOD) της ελεγχόμενης ουσίας, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης ενός δοχείου αντίδρασης του ίδιου σχήματος, χωρητικότητας άνω του ενός λίτρου, ώστε να μπορεί να ληφθεί επαρκής όγκος νερού για χημική εκχύλιση και ανάλυση. Έτσι επιτυγχάνονται υψηλότερες συγκεντρώσεις στο υδατικό εκχύλισμα και, συνεπώς, πιο αξιόπιστος αναλυτικός προσδιορισμός. Στο προσάρτημα 1 παρατίθεται πίνακας με εκτιμήσεις του ελάχιστου απαιτούμενου όγκου, του LOD της ένωσης, του εκτιμώμενου λογαρίθμου του P_{OW} και της διαλυτότητάς της. Ο πίνακας βασίζεται στη σχέση μεταξύ του λογαρίθμου του P_{OW} και του λόγου των διαλυτοτήτων σε οκτανόλη και σε νερό, κατά Pinsuwanet al. (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

όπου

$SR = S_{oct}/S_w$ (σε γραμμομοριακότητα κατ' όγκο),

και η σχέση που παρέχει ο Lyman (15) για την πρόβλεψη της υδατοδιαλυτότητας. Οι διαλυτότητες στο νερό που υπολογίζονται μέσω της αναφερόμενης στο προσάρτημα 1 εξίσωσης πρέπει να θεωρούνται ως πρώτη εκτίμηση. Επισημαίνεται ότι ο χρήστης είναι ελεύθερος να προβεί σε εκτίμηση της υδατοδιαλυτότητας μέσω οιασδήποτε σχέσης θεωρείται ότι παριστά πληρέστερα τη σχέση μεταξύ υδρόφοβου χαρακτήρα και διαλυτότητας. Για τις στερεές ουσίες συνιστάται, π.χ., η συνεκτίμηση του σημείου τήξεως στην πρόβλεψη της διαλυτότητας. Σε περίπτωση χρήσης τροποποιημένης εξίσωσης, πρέπει να ελέγχεται αν εξακολουθεί να ισχύει η εξίσωση για τον υπολογισμό της διαλυτότητας σε οκτανόλη. Μια σχηματική απεικόνιση ενός δοχείου ανάδευσης με γυάλινο χιτώνιο, χωρητικότητας περίπου ενός λίτρου, παρουσιάζεται στο προσάρτημα 2. Οι αναλογίες του δοχείου που παρουσιάζονται στο προσάρτημα 2 έχουν αποδειχθεί ευνοϊκές και θα πρέπει να διατηρούνται όταν χρησιμοποιείται συσκευή άλλου μεγέθους,

— κατά το πείραμα αργής ανάδευσης, είναι απαραίτητη η ύπαρξη μέσου διατήρησης της θερμοκρασίας σε σταθερά επίπεδα.

18. Τα δοχεία θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα από αδρανές υλικό, έτσι ώστε η προσρόφηση στις επιφάνειες του δοχείου να είναι αμελητέα.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής

19. Ο προσδιορισμός του P_{OW} θα πρέπει να εκτελείται με την υψηλότερης καθαρότητας οκτανόλη-1 που είναι διαθέσιμη στο εμπόριο (τουλάχιστον + 99 %). Συνιστάται καθαρισμός της οκτανόλης-1 μέσω εκχύλισης με οξύ, βάση και νερό και, ακολούθως, ξήρανση. Επιπροσθέτως, είναι δυνατή η απόσταξη για τον καθαρισμό της οκτανόλης-1. Η καθαρισμένη οκτανόλη-1 πρέπει να χρησιμοποιείται για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων των ελεγχόμενων ουσιών. Το νερό που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό του P_{OW} πρέπει να είναι νερό απεσταγμένο σε γυάλινη ή χαλαζιακή συσκευή ή νερό που έχει ληφθεί από σύστημα καθαρισμού ή νερό βαθμού HPLC. Απαιτείται διήθηση μέσω ηθμού των 0,22 μm για το απεσταγμένο νερό και θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται τυφλά διαλύματα ώστε να εξακριβώνεται ότι δεν υπάρχουν προσμείξεις στα συμπυκνωμένα εκχυλίσματα που να παρεμποδίζουν την ελεγχόμενη ουσία. Αν χρησιμοποιείται ηθμός από ίνες γυαλιού, αυτός πρέπει να καθαρίζεται με θέρμανση στους 400 °C για τρεις ώρες τουλάχιστον.

20. Οι δύο διαλύτες υποβάλλονται σε αμοιβαίο κορεσμό πριν από το πείραμα, αφηνόμενοι να φθάσουν σε κατάσταση ισορροπίας σε ένα αρκούντως μεγάλο δοχείο. Αυτό επιτυγχάνεται με αργή ανάδευση του διφασικού συστήματος για δύο ημέρες.

21. Επιλέγεται κατάλληλη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας και διαλύεται σε οκτανόλη-1 (που έχει κορεσθεί με νερό). Ο συντελεστής κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού πρέπει να προσδιορίζεται σε αραιά διαλύματα σε οκτανόλη-1 και νερό. Ως εκ τούτου, η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας δεν πρέπει να υπερβαίνει το 70 % της διαλυτότητάς της, με μέγιστη συγκέντρωση 0,1 M και στις δύο φάσεις (1). Τα διαλύματα οκτανόλης-1 που χρησιμοποιούνται για το πείραμα πρέπει να είναι απηλλαγμένα αιωρούμενης στερεάς ελεγχόμενης ουσίας.

22. Κατάλληλη ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας διαλύεται σε οκτανόλη-1 (που έχει κορεσθεί με νερό). Εάν η εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{OW} υπερβαίνει το πέντε, θα πρέπει να εξασφαλίζεται ότι τα διαλύματα οκτανόλης-1 που χρησιμοποιούνται για το πείραμα είναι απαλλαγμένα αιωρούμενης στερεάς ελεγχόμενης ουσίας. Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόζεται η ακόλουθη διαδικασία για χημικές ουσίες με εκτιμώμενη τιμή λογαρίθμου του $P_{OW} > 5$:

— η ελεγχόμενη ουσία διαλύεται σε οκτανόλη-1 (που έχει κορεσθεί με νερό),

▼M4

— παρέχεται επαρκές χρονικό διάστημα στο διάλυμα ώστε να καθιζήσει η αιωρούμενη στερεά ουσία. Κατά την περίοδο της καθίζησης, παρακολουθείται η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας,

— όταν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις στο διάλυμα οκτανόλης-1 φθάσουν σε σταθερές τιμές, το διάλυμα παρακαταθήκης αραιώνεται με κατάλληλο όγκο οκτανόλης-1,

— μετράται η συγκέντρωση του αραιωμένου διαλύματος παρακαταθήκης. Εάν η μετρούμενη συγκέντρωση ανταποκρίνεται στην αραίωση, το αραιωμένο διάλυμα παρακαταθήκης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο πείραμα αργής ανάδευσης.

Εκχύλιση και ανάλυση των δειγμάτων

23. Για τη δοκιμασία της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να χρησιμοποιείται επικυρωμένη αναλυτική μέθοδος. Οι αναλυτές οφείλουν να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις στην κορεσμένη με νερό οκτανόλη-1, καθώς και στην κορεσμένη με οκτανόλη-1 υδατική φάση, κατά τη διάρκεια του πειράματος, υπερβαίνουν το μεθοδολογικό όριο ποσοτικού προσδιορισμού των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών διαδικασιών. Οι αναλυτικές ανακτήσεις της ελεγχόμενης ουσίας από την υδατική φάση και από τη φάση της οκτανόλης-1 πρέπει να έχουν καθοριστεί πριν από την εκτέλεση του πειράματος, στις περιπτώσεις όπου είναι αναγκαία η εφαρμογή μεθόδων εκχύλισης. Το αναλυτικό σήμα πρέπει να διορθώνεται για να ληφθούν υπόψη τα τυφλά διαλύματα, ενώ πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να είναι αδύνατη η μεταφορά αναλυόμενης ουσίας από το ένα δείγμα στο άλλο.

24. Ενδέχεται να απαιτείται, πριν από την ανάλυση, εκχύλιση της υδατικής φάσης με οργανικό διαλύτη και προσυμπύκνωση του εκχυλίσματος, λόγω των σχετικά χαμηλών συγκεντρώσεων των υδρόφοβων ελεγχόμενων ουσιών στην υδατική φάση. Για τον ίδιο λόγο, είναι αναγκαίο να μειώνονται οι ενδεχόμενες συγκεντρώσεις στα τυφλά διαλύματα. Προς τον σκοπό αυτό, είναι αναγκαίο να χρησιμοποιούνται διαλύτες υψηλής καθαρότητας, κατά προτίμηση διαλύτες για ανάλυση καταλοίπων. Επιπλέον, η χρησιμοποίηση προσεκτικά προκαθαρισμένων γυάλινων σκευών (π.χ. έκπλυση με διαλύτες ή θέρμανση σε αυξημένες θερμοκρασίες) μπορεί να συμβάλει στην αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης.

25. Εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{OW} είναι δυνατόν να ληφθεί μέσω προγράμματος εκτιμήσεων ή με βάση την κρίση των ειδικών. Εάν η τιμή είναι υψηλότερη του έξι, πρέπει να παρακολουθούνται επισταμένως τόσο οι διορθώσεις για το τυφλό διάλυμα, όσο και η μεταφορά της αναλυόμενης ουσίας. Ομοίως, εάν η εκτίμηση του λογαρίθμου P_{OW} υπερβαίνει το έξι, είναι υποχρεωτική η χρήση υποκατάστατου προτύπου για τη διόρθωση της ανάκτησης, ώστε να είναι δυνατή η επίτευξη υψηλών συντελεστών προσυμπύκνωσης. Υπάρχουν στο εμπόριο αρκετά προγράμματα λογισμικού για την εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{OW} [1], π.χ. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) και ACD log P (19). Περιγραφές των προσεγγίσεων εκτίμησης είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία (20-22).

26. Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας σε οκτανόλη-1 και νερό καθορίζονται με τη χρήση αποδεκτών μεθόδων. Κατά γενικό κανόνα, το μεθοδολογικό όριο ποσοτικού προσδιορισμού μπορεί να οριστεί ως η συγκέντρωση σε νερό ή σε οκτανόλη-1 που παράγει λόγο σήματος προς θόρυβο ίσο προς δέκα. Πρέπει να επιλέγεται κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης και προσυμπύκνωσης και να καθορίζονται οι αναλυτικές ανακτήσεις. Επιλέγεται κατάλληλος συντελεστής προσυμπύκνωσης, προκειμένου να λαμβάνεται, στον αναλυτικό προσδιορισμό, σήμα του απαιτούμενου μεγέθους.

[1] Η πληροφορία αυτή παρέχεται μόνο για τη διευκόλυνση των χρηστών. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα, ισοδύναμα προγράμματα υπολογιστών, εφόσον έχει αποδειχθεί ότι αποδίδουν τα ίδια αποτελέσματα.

▼M4

27. Βάσει των παραμέτρων της αναλυτικής μεθόδου και των αναμενόμενων συγκεντρώσεων, καθορίζεται ένα κατά προσέγγιση απαιτούμενο μέγεθος δείγματος για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ένωσης. Πρέπει να αποφεύγεται η χρήση υδατικών δειγμάτων των οποίων το μέγεθος είναι υπερβολικά μικρό για τη λήψη κατάλληλου αναλυτικού σήματος. Επίσης, θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση υπερβολικά μεγάλων υδατικών δειγμάτων, καθώς, σε αντίθετη περίπτωση, ενδέχεται να απομένει πολύ λίγο νερό για τον ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό αναλύσεων (n = 5). Στο προσάρτημα 1, η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα δείγματος υποδεικνύεται σε συνάρτηση με τη χωρητικότητα του δοχείου, καθώς και με το LOD και τη διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας.

28. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ελεγχόμενων ουσιών διενεργείται με σύγκριση με τις καμπύλες βαθμονόμησης (διακρίβωσης) της αντίστοιχης ένωσης. Οι συγκεντρώσεις των αναλυόμενων δειγμάτων πρέπει να περικλείονται από τις συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων.

29. Για ελεγχόμενες ουσίες με εκτίμηση λογαρίθμου του P_{OW} υψηλότερη του έξι, θα πρέπει να εισάγεται στο υδατικό δείγμα ένα υποκατάστατο πρότυπο πριν από την εκχύλιση, ώστε να καταγράφονται οι απώλειες που προκύπτουν κατά την εκχύλιση και την προ-συγκέντρωση των υδατικών δειγμάτων. Προκειμένου η διόρθωση ανάκτησης να είναι ακριβής, τα υποκατάστατα πρέπει να έχουν ιδιότητες παρεμφερείς ή πανομοιότυπες με αυτές της ελεγχόμενης ουσίας. Κατά προτίμηση, χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό (σταθερά) ανάλογα των ουσιών που ενδιαφέρουν, τα οποία είναι σημασμένα με ισότοπα (π.χ. υπερδευτεριωμένα ή σημασμένα με ^{13}C). Εάν δεν είναι δυνατή η χρήση σταθερών αναλόγων τα οποία είναι σημασμένα με ισότοπα, π.χ. ^{13}C ή ^{2}H, θα πρέπει να αποδεικνύεται, με αξιόπιστα στοιχεία από τη βιβλιογραφία, ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες του υποκατάστατου είναι σχεδόν πανομοιότυπες με αυτές της ελεγχόμενης ουσίας. Κατά την εκχύλιση υγρού-υγρού της υδατικής φάσης, είναι δυνατόν να σχηματιστούν γαλακτώματα. Ο σχηματισμός τους μπορεί να περιοριστεί με την προσθήκη άλατος, μετά την οποία το γαλάκτωμα αφήνεται σε ηρεμία κατά τη διάρκεια της νύχτας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση και την προσυμπύκνωση των δειγμάτων πρέπει να αναφέρονται.

30. Τα δείγματα που λαμβάνονται από τη φάση της οκτανόλης-1 μπορούν, εάν χρειαστεί, να αραιωθούν με κατάλληλο διαλύτη πριν από την ανάλυση. Επίσης, συνιστάται να χρησιμοποιούνται υποκατάστατα πρότυπα για τη διόρθωση ανάκτησης στην περίπτωση των ουσιών για τις οποίες τα πειράματα ανάκτησης έχουν δείξει υψηλό βαθμό διακύμανσης (σχετική τυπική απόκλιση > 10 %).

31. Πρέπει να αναφέρονται οι λεπτομέρειες της αναλυτικής μεθόδου. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται η μέθοδος εκχύλισης, οι συντελεστές προσυμπύκνωσης και αραίωσης, οι παράμετροι των οργάνων, οι πάγιες πρακτικές βαθμονόμησης, η κλίμακα βαθμονόμησης, η αναλυτική ανάκτηση της ελεγχόμενης ουσίας από το νερό, η προσθήκη υποκατάστατων προτύπων για τη διόρθωση ανάκτησης, οι τιμές των τυφλών διαλυμάτων, τα όρια ανίχνευσης και τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού.

Εκτέλεση της δοκιμής

Βέλτιστοι λόγοι όγκων οκτανόλης-1/νερού

32. Κατά την επιλογή των όγκων νερού και οκτανόλης-1, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη το LOQ σε οκτανόλη-1 και σε νερό, οι συντελεστές προσυμπύκνωσης που χρησιμοποιούνται στα υδατικά δείγματα, οι όγκοι των δειγμάτων οκτανόλης-1 και νερού και οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις. Για πειραματικούς λόγους, ο όγκος της οκτανόλης-1 στο σύστημα αργής ανάδευσης πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπον ώστε η στιβάδα της να έχει ικανοποιητικό πάχος (> 0,5 cm), προκειμένου να καθίσταται δυνατή η δειγματοληψία από τη φάση της οκτανόλης-1, χωρίς αυτή να διαταράσσεται.

33. Οι τυπικοί λόγοι φάσεων που χρησιμοποιούνται για τους προσδιορισμούς ενώσεων με λογάριθμο του P_{OW} 4,5 και άνω, είναι 20 έως 50 ml οκτανόλης-1 και 950 έως 980 ml νερού σε δοχείο χωρητικότητας ενός λίτρου.

▼**M4**

Συνθήκες δοκιμής

34. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, το δοχείο αντίδρασης θερμοστατείται ώστε να μειώνεται η διακύμανση της θερμοκρασίας σε λιγότερο από 1 °C. Η δοκιμασία θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία 25 °C.

35. Το πειραματικό σύστημα πρέπει να προφυλάσσεται από το φως της ημέρας, είτε με την εκτέλεση του πειράματος σε σκοτεινό θάλαμο, είτε με την κάλυψη του δοχείου αντίδρασης με φύλλο αλουμινίου.

36. Το πείραμα πρέπει να εκτελείται σε περιβάλλον απαλλαγμένο, στο μέτρο του δυνατού, από σκόνη.

37. Το σύστημα οκτανόλης-1/νερού αναδεύεται έως ότου επιτευχθεί ισορροπία. Σε ένα πιλοτικό πείραμα, υπολογίζεται η διάρκεια της περιόδου εξισορρόπησης με την εκτέλεση πειράματος αργής ανάδευσης και τη λήψη δειγμάτων νερού και οκτανόλης-1 ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Οι χρόνοι δειγματοληψίας πρέπει να απέχουν μεταξύ τους τουλάχιστον πέντε ώρες.

38. Για κάθε προσδιορισμό του P_{OW} θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα αργής ανάδευσης.

Προσδιορισμός του χρόνου εξισορρόπησης

39. Θεωρείται ότι επιτυγχάνεται ισορροπία όταν η παλινδρόμηση του λόγου συγκεντρώσεων σε οκτανόλη-1/νερό συναρτήσει του χρόνου κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου τεσσάρων χρονικών σημείων δίνει κλίση που δεν διαφέρει σημαντικά από το μηδέν στο επίπεδο p του 0,05. Ο ελάχιστος χρόνος εξισορρόπησης είναι μία ημέρα πριν από την έναρξη της δειγματοληψίας. Κατά κανόνα, η δειγματοληψία ουσιών με εκτιμώμενο λογάριθμο του P_{OW} μικρότερο του πέντε μπορεί να πραγματοποιείται τη δεύτερη και την τρίτη ημέρα. Όταν πρόκειται για περισσότερο υδρόφοβες ενώσεις, ενδέχεται να πρέπει να παραταθεί η εξισορρόπηση. Για μια ένωση με λογάριθμο του P_{OW} της τάξης του 8,23 (δεκαχλωροδιφαινύλιο), 144 ώρες ήταν αρκετές για την εξισορρόπηση. Η ισορροπία εκτιμάται με επανειλημμένη δειγματοληψία από ένα και μόνο δοχείο.

Έναρξη του πειράματος

40. Στην αρχή του πειράματος, το δοχείο αντίδρασης πληρούται με νερό κορεσμένο με οκτανόλη-1. Πρέπει να εξασφαλίζεται επαρκές χρονικό διάστημα για την επίτευξη της ρυθμισμένης θερμοκρασίας.

41. Προστίθεται προσεκτικά στο δοχείο αντίδρασης η επιθυμητή ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας (διαλυμένης στον απαιτούμενο όγκο κορεσμένης με νερό οκτανόλης-1). Πρόκειται για κρίσιμο στάδιο του πειράματος, δεδομένου ότι πρέπει να αποφεύγεται η τυρβώδης ανάμειξη των δύο φάσεων. Προς τον σκοπό αυτό, η φάση της οκτανόλης-1 φέρεται αργά με σιφώνιο που ακουμπά στο τοίχωμα του δοχείου του πειράματος, κοντά στην επιφάνεια του νερού. Στη συνέχεια. αυτή κυλά κατά μήκος του γυάλινου τοιχώματος και σχηματίζει υμένιο πάνω από την υδατική φάση. Πρέπει πάντοτε να αποφεύγεται η μετάγγιση της οκτανόλης-1 απευθείας στο δοχείο· απαγορεύεται η άμεση πτώση σταγόνων οκτανόλης-1 στο νερό.

42. Μετά την έναρξη της ανάδευσης, πρέπει να αυξάνεται με αργούς ρυθμούς η ταχύτητα ανάδευσης. Εάν οι συσκευές ανάδευσης δεν μπορούν να ρυθμιστούν καταλλήλως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετασχηματιστής. Η ταχύτητα ανάδευσης πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε να δημιουργείται στρόβιλος βάθους 0,5 έως 2,5 cm στη μεσεπιφάνεια νερού/οκτανόλης-1. Η ταχύτητα ανάδευσης θα πρέπει να μειώνεται εάν το βάθος του στροβίλου υπερβεί τα 2,5 cm. Σε αντίθετη περίπτωση, ενδέχεται να σχηματιστούν μικροσταγονίδια οκτανόλης-1 στην υδατική φάση, προκαλώντας υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στο νερό. Η μέγιστη ταχύτητα ανάδευσης των 2,5 cm συνιστάται βάσει των ευρημάτων της μελέτης επικύρωσης με κυκλική δοκιμή (5). Αποτελεί συμβιβασμό μεταξύ της επίτευξης ταχείας εξισορρόπησης και του περιορισμού του σχηματισμού μικροσταγονιδίων οκτανόλης-1.

▼**M4**

Δειγματοληψία και κατεργασία δείγματος

43. Ο αναδευτήρας πρέπει να τίθεται εκτός λειτουργίας πριν από τη δειγματοληψία και πρέπει να επιτυγχάνεται η ακινησία των υγρών. Μετά την ολοκλήρωση της δειγματοληψίας, ο αναδευτήρας τίθεται εκ νέου σε λειτουργία με αργούς ρυθμούς, όπως περιγράφεται ανωτέρω, και στη συνέχεια η ταχύτητα ανάδευσης αυξάνεται σταδιακά.

44. Τα δείγματα της υδατικής φάσης λαμβάνονται από στρόφιγγα που βρίσκεται στον πυθμένα του δοχείου αντίδρασης. Πάντοτε πρέπει να απορρίπτεται ο νεκρός όγκος νερού που περιέχεται στη στρόφιγγα (περίπου 5 ml στο δοχείο που εμφαίνεται στο προσάρτημα 2). Το νερό στις στρόφιγγες δεν αναδεύεται και, ως εκ τούτου, δεν βρίσκεται σε ισορροπία με τον κύριο όγκο. Σημειώνεται ο όγκος των υδατικών δειγμάτων και εξασφαλίζεται ότι η ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας που περιέχεται στο απορριπτόμενο νερό συνυπολογίζεται στο ισοζύγιο μάζας. Οι απώλειες μέσω εξάτμισης πρέπει να ελαχιστοποιούνται, με μέριμνα για την ομαλή ροή του νερού στη διαχωριστική χοάνη, ώστε να μη διαταράσσεται η στιβάδα νερού/οκτανόλης-1.

45. Τα δείγματα οκτανόλης-1 λαμβάνονται με την αφαίρεση γνωστού κλάσματος (περίπου 100 μl) από τη στιβάδα της οκτανόλης-1, με τη βοήθεια σύριγγας των 100 μικρολίτρων από γυαλί και μέταλλο. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη διαταράσσεται η οριακή στιβάδα. Καταγράφεται ο όγκος του υγρού δείγματος. Επαρκεί μικρό γνωστό κλάσμα, δεδομένου ότι το δείγμα οκτανόλης-1 θα αραιωθεί.

46. Πρέπει να αποφεύγονται οι περιττές μεταφορές των δειγμάτων. Προς τον σκοπό αυτό, η ποσότητα του δείγματος πρέπει να προσδιορίζεται με σταθμική ανάλυση. Σε περίπτωση υδατικών δειγμάτων, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη συλλογή του υδατικού δείγματος σε διαχωριστική χοάνη, η οποία ήδη περιέχει τον απαιτούμενο όγκο διαλύτη.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

47. Σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, ο P_{OW} προσδιορίζεται με την εκτέλεση τριών πειραμάτων αργής ανάδευσης (τρεις πειραματικές μονάδες) με την ελεγχόμενη ένωση, υπό τις ίδιες συνθήκες. Η παλινδρόμηση που χρησιμοποιείται για να καταδειχθεί η επίτευξη ισορροπίας θα πρέπει να βασίζεται στα αποτελέσματα τουλάχιστον τεσσάρων προσδιορισμών του C_O/C_W σε διαδοχικά χρονικά σημεία. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να υπολογιστεί η διασπορά, ως μέτρο της αβεβαιότητας της μέσης τιμής που λαμβάνεται από κάθε πειραματική μονάδα.

48. Ο P_{OW} μπορεί να χαρακτηριστεί από τη διασπορά των δεδομένων που λαμβάνονται από κάθε πειραματική μονάδα. Η πληροφορία αυτή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του P_{OW} ως σταθμισμένου μέσου όρου των αποτελεσμάτων των επιμέρους πειραματικών μονάδων. Προς τον σκοπό αυτόν, χρησιμοποιείται ως στάθμιση το αντίστροφο της διασποράς των αποτελεσμάτων των πειραματικών μονάδων. Κατά συνέπεια, τα δεδομένα που παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα (εκφραζόμενη ως διασπορά) και, συνεπώς, χαρακτηρίζονται από χαμηλότερη αξιοπιστία, επηρεάζουν λιγότερο τα αποτελέσματα απ' ό,τι τα δεδομένα με χαμηλή διασπορά.

49. Κατ' αναλογία, υπολογίζεται η σταθμισμένη τυπική απόκλιση, η οποία χαρακτηρίζει την επαναληψιμότητα της μέτρησης του P_{OW}. Μια χαμηλή τιμή σταθμισμένης τυπικής απόκλισης υποδηλώνει ότι ο προσδιορισμός του P_{OW} εμφανίζει μεγάλη ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα. Η επίσημη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων περιγράφεται κατωτέρω.

▼M4

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Κατάδειξη της επίτευξης ισορροπίας

50. Υπολογίζεται για κάθε χρόνο δειγματοληψίας ο λογάριθμος του λόγου των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας σε οκτανόλη-1 και σε νερό [log (C_O/C_w)]. Η επίτευξη χημικής ισορροπίας καταδεικνύεται με γραφική παράσταση του λόγου αυτού συναρτήσει του χρόνου. Το οριζόντιο τμήμα της συγκεκριμένης γραφικής παράστασης, που στηρίζεται σε τέσσερα τουλάχιστον διαδοχικά χρονικά σημεία, υποδηλώνει ότι έχει επιτευχθεί ισορροπία και ότι η ένωση έχει όντως διαλυθεί στην οκτανόλη-1. Εάν αυτό δεν συμβαίνει, η δοκιμή θα πρέπει να συνεχίζεται έως ότου τέσσερα διαδοχικά χρονικά σημεία να δίνουν κλίση που δεν διαφέρει σημαντικά από το 0 στο επίπεδο p του 0,05, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο λογάριθμος του C_o/C_w είναι ανεξάρτητος του χρόνου.

Υπολογισμός του λογαρίθμου του P_{OW}

51. Η τιμή του λογαρίθμου του P_{OW} της πειραματικής μονάδας υπολογίζεται ως η σταθμισμένη μέση τιμή του λογαρίθμου του C_o/C_w για το τμήμα της καμπύλης του λογαρίθμου του C_o/C_w συναρτήσει του χρόνου, για το οποίο έχει καταδειχθεί ισορροπία. Ο σταθμισμένος μέσος όρος υπολογίζεται με στάθμιση των δεδομένων με το αντίστροφο της διασποράς, ώστε η επίδρασή τους στο τελικό αποτέλεσμα να είναι αντιστρόφως ανάλογη της αβεβαιότητάς τους.

Μέσος λογάριθμος του P_{OW}

52. Η μέση τιμή του λογαρίθμου του P_{OW} των διαφόρων πειραματικών μονάδων υπολογίζεται ως ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των επιμέρους πειραματικών μονάδων, σταθμισμένων με τις αντίστοιχες διασπορές.

Ο υπολογισμός πραγματοποιείται ως εξής:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

όπου

$\log P_{OW,i}$ = η τιμή του λογαρίθμου του P_{OW} της επιμέρους πειραματικής μονάδας i·

$\log P_{OW,Av}$ = η σταθμισμένη μέση τιμή των επιμέρους προσδιορισμών του λογαρίθμου του P_{OW}·

w_i = το στατιστικό βάρος που αποδίδεται στην τιμή του λογαρίθμου του P_{OW} της πειραματικής μονάδας i.

Ως w_i χρησιμοποιείται το αντίστροφο της διασποράς του λογαρίθμου του $P_{OW,i}$ $(w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1})$

53. Το σφάλμα του μέσου όρου του λογαρίθμου του P_{OW} εκτιμάται ως η επαναληψιμότητα του log C_o/C_w που έχει προσδιοριστεί κατά τη φάση ισορροπίας στις επιμέρους πειραματικές μονάδες. Εκφράζεται ως η σταθμισμένη τυπική απόκλιση του λογαρίθμου του $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$), η οποία αποτελεί, με τη σειρά της, μέτρο του σφάλματος που συνδέεται με τον λογάριθμο του $P_{OW,Av}$. Η σταθμισμένη τυπική απόκλιση μπορεί να υπολογιστεί από τη σταθμισμένη διασπορά ($\text{var}_{\log Pow,Av}$) ως εξής:

$$\text{var}_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (\text{var}_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Το σύμβολο n παριστά τον αριθμό των πειραματικών μονάδων.

▼M4

Έκθεση δοκιμής

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

Ελεγχόμενη ουσία:

— κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος (συμπεριλαμβανομένης της θέσης του ιχνηθέτη όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ουσία) και σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλέπε παράγραφο 17),

— καθαρότητα (ξένες προσμείξεις) της ελεγχόμενης ουσίας,

— καθαρότητα του ιχνηθέτη των σημασμένων χημικών ουσιών και γραμμομοριακή δραστικότητα (κατά περίπτωση),

— προκαταρκτική εκτίμηση του λογαρίθμου του P_{ow}, καθώς και μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της τιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— ημερομηνίες διεξαγωγής των μελετών,

— θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του πειράματος,

— όγκοι οκτανόλης-1 και νερού στην αρχή της δοκιμής,

— όγκοι ληφθέντων δειγμάτων οκτανόλης-1 και νερού,

— όγκοι οκτανόλης-1 και νερού που απέμειναν στα δοχεία της δοκιμής·

— περιγραφή των δοχείων της δοκιμής και των συνθηκών ανάδευσης (σχήμα της ράβδου ανάδευσης και του δοχείου της δοκιμής, ύψος του στροβίλου, σε mm, και ταχύτητα ανάδευσης, εάν είναι γνωστή),

— αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας και το μεθοδολογικό όριο ποσοτικού προσδιορισμού,

— χρόνοι δειγματοληψιών,

— pH της υδατικής φάσης και χρησιμοποιηθέντα ρυθμιστικά διαλύματα, σε περίπτωση ρύθμισης του pH προκειμένου για μόρια που μπορούν να ιοντιστούν,

— πλήθος προσδιορισμών (replicates).

Αποτελέσματα:

— επαναληψιμότητα και ευαισθησία των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν,

— προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας σε οκτανόλη-1 και νερό, σε συνάρτηση με τον χρόνο,

— κατάδειξη του ισοζυγίου μάζας,

— θερμοκρασία και τυπική απόκλιση ή εύρος θερμοκρασιών κατά τη διεξαγωγή του πειράματος,

— παλινδρόμηση του λόγου συγκεντρώσεων σε συνάρτηση με τον χρόνο,

— μέση τιμή του λογαρίθμου του $P_{ow,Av}$ και τυπικό σφάλμα της τιμής αυτής,

— συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων,

▼**M4**

— παραδείγματα ανεπεξέργαστων αριθμητικών δεδομένων αντιπροσωπευτικών αναλύσεων (όλα τα ανεπεξέργαστα δεδομένα πρέπει να αποθηκεύονται σύμφωνα με τα πρότυπα ορθής εργαστηριακής πρακτικής), συμπεριλαμβανομένων των ανακτήσεων των υποκατάστατων και του πλήθους επιπέδων που χρησιμοποιήθηκαν στη βαθμονόμηση (με τα κριτήρια για τον συντελεστή συσχέτισης της καμπύλης βαθμονόμησης), και αποτελέσματα της διασφάλισης ποιότητας/του ποιοτικού ελέγχου (QA/QC),

— όταν είναι διαθέσιμη: έκθεση επικύρωσης της διαδικασίας δοκιμασιών (πρέπει να αναφέρεται στη βιβλιογραφία).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) De Bruijn J.H.M., Busser F., Seinen W., Hermens J. (1989), Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

(2) Κεφάλαιο Α.8 του παρόντος παραρτήματος: Συντελεστής κατανομής.

(3) Κεφάλαιο Α.8 του παρόντος παραρτήματος: Συντελεστής κατανομής.

(4) OECD (2000), OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances, Paris.

(5) Tolls J. (2002), Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report, RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000), Handbook of property estimation methods for chemicals, Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993), Environmental Organic Chemistry, Wiley, New York, NY.

(8) Arnold C.G., Widenhaupt A., David M.M., Müller S.R., Haderlein S.B., Schwarzenbach R.P. (1997), Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition, *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

(9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water, Paris.

(10) Κεφάλαιο Α.6 του παρόντος παραρτήματος: Υδατοδιαλυτότητα.

(11) Κεφάλαιο Γ.7 του παρόντος παραρτήματος: Αποικοδόμηση — Αβιοτική αποικοδόμηση: υδρόλυση ως συνάρτηση του pH.

(12) Κεφάλαιο Γ.4 — Μέρη II-VII (μέθοδοι Α έως Ζ) του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας.

(13) Κεφάλαιο Α.4 του παρόντος παραρτήματος: Τάση ατμών.

(14) Pinsuwan S., Li A. και Yalkowsky S.H. (1995), «Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients», *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

(15) Lyman W.J. (1990), Solubility in water, στο: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 έως 2-52.

(16) Leo A., Weininger D. (1989), Medchem Software Manual, Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W. (1993), SRC-LOGKOW for Windows, SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L. (1992), ProLogP, Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP, Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman W.J. (1990), Octanol/water partition coefficient, στο Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., (eds), *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker R.F., de Kort H.M. (1979), «The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set», *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

(22) Jübermann O., (1958). Houben-Weyl, ed., *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Προσάρτημα 1

Υπολογιστικό φύλλο για τον υπολογισμό των ελάχιστων όγκων νερού που απαιτούνται για την ανίχνευση ελεγχόμενων ουσιών με διαφορετικό λογάριθμο του P_{OW} στην υδατική φάση

Παραδοχές:

— Μέγιστος όγκος επιμέρους γνωστών κλασμάτων = 10 % του συνολικού όγκου· 5 γνωστά κλάσματα = 50 % του συνολικού όγκου.

— Συγκέντρωσητωνελεγχόμενωνουσιών $= 0,7 \times$ διαλυτότητα και στις δύο φάσεις. Σε περίπτωση χαμηλότερων συγκεντρώσεων, απαιτούνται μεγαλύτεροι όγκοι.

— Όγκος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης (LOD) = 100 ml.

— Οι σχέσεις λογάριθμος του P_{ow} προς λογάριθμο του S_w και λογάριθμος του P_{ow} προς SR (S_{oct}/S_w) παριστούν εύλογα τις σχέσεις στην περίπτωση των ελεγχόμενων ουσιών.

Εκτίμηση του S_w

log P_{ow}	Εξίσωση	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,496	3 133E+00
4,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,035	1 084E+00
5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,426	3 750E-01
5,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,887	1 297E-01
6	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,348	4 487E-02
6,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,809	1 552E-02
7	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,270	5 370E-03
7,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,731	1 858E-03
8	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 3,192	6 427E-04

Εκτίμηση του S_{oct}

log P_{ow}	εξίσωση	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$	3 763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$	4 816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$	6 165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$	7 890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$	1 010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$	1 293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$	1 654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$	2 117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$	2 710E+05

▼**M4**

Συνολική μάζα ελεγχόμενης ουσίας (mg)	$Mass_{oct}/Mass_{water}$	$Mass_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Mass_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	166 436	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	526 316	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Υπολογισμός όγκων

Ελάχιστος απαιτούμενος όγκος για τη φάση H_2O σε κάθε συγκέντρωση LOD

log K_{ow}	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Χρησιμοποιούμενος όγκος για το LOD (l)	0,1					

Κλείδα των υπολογισμών

Αντιπροσωπεύει < 10 % του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης, δοχείο εξισορρόπησης 1 λίτρου.

Αντιπροσωπεύει < 10 % του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης, δοχείο εξισορρόπησης 2 λίτρων.

Αντιπροσωπεύει < 10 % του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης, δοχείο εξισορρόπησης 5 λίτρων.

Αντιπροσωπεύει < 10 % του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης, δοχείο εξισορρόπησης 10 λίτρου.

Υπερβαίνει το 10 % ακόμη και του δοχείου εξισορρόπησης 10 λίτρων.

▼**M4**

Ανασκόπηση των απαιτούμενων όγκων ως συνάρτηση της υδατοδιαλυτότητας και του λογαρίθμου του P_{ow}

Ελάχιστος απαιτούμενος όγκος για τη φάση H_2O σε κάθε συγκέντρωση LOD (ml)

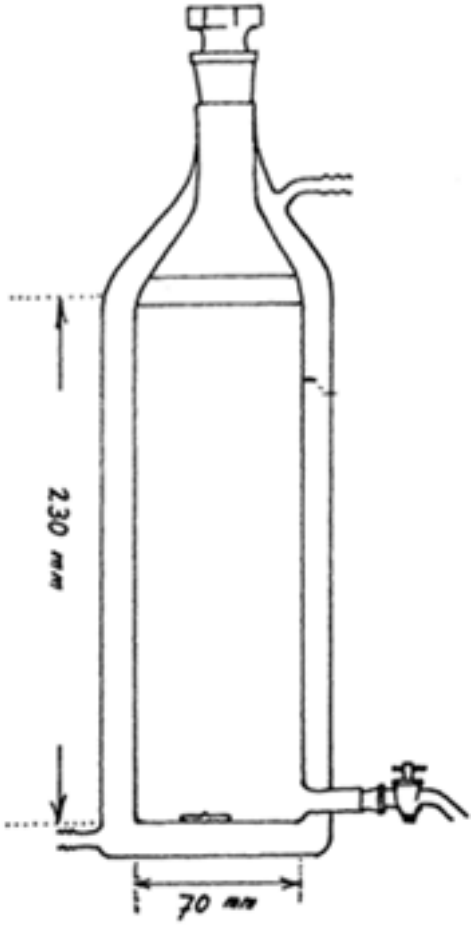
log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Χρησιμοποιούμενος όγκος για το LOD (l)		0,1					

Προσάρτημα 2

Παράδειγμα δοκιμαστικού δοχείου με γυάλινο χιτώνιο για τον προσδιορισμό του P_{OW} με πείραμα αργής ανάδευσης



▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΜΕΡΟΣ Β: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Β.1α. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ — ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΔΟΣΕΩΝ

Β.1β. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ — ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΕΩΝ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Β.2. ΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Β.3. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ)

Β.4. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Β.5. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

Β.6. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Β.7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ, 28 ΗΜΕΡΩΝ, ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

Β.8. ΥΠΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ 28 ΗΜΕΡΩΝ

Β.9. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ (28 ΗΜΕΡΕΣ) ΔΟΣΗΣ (ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ)

Β.10. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΠΩΝ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

Β.11. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — *IN VIVO* ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΠΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

Β.12. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — *IN VIVO* ΔΟΚΙΜΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Β.13/14. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Β.15. ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Β.16. ΜΙΤΩΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Β.17. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

Β.18. ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ DNA — ΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ DNA — ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ — *IN VITRO*

Β.19. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΑΔΕΛΦΩΝ ΧΡΩΜΑΤΙΔΩΝ IN VITRO

Β.20. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΟΥ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΟΣ ΣΕ DROSOPHILA MELANOGASTER

▼B

Β.21.	ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ *IN VITRO*
Β.22.	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΟΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ
Β.23.	ΔΟΚΙΜΗ ΣΠΕΡΜΟΓΟΝΙΑΚΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΕΚΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ
Β.24.	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΗΛΙΔΑΣ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟ
Β.25.	ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΙΜΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ
Β.26.	ΔΟΚΙΜΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ —ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ
Β.27.	ΔΟΚΙΜΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ — ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ ΣΕ ΜΗ ΤΡΩΚΤΙΚΑ
Β.28.	ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ — ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ
Β.29.	ΥΠΟΧΡΟΝΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ
Β.30.	ΜΕΛΕΤΕΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ
Β.31.	ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
Β.32.	ΜΕΛΕΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
Β.33.	ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ/ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
Β.34.	ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ
Β.35.	ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΥΟ ΓΕΝΕΩΝ
Β.36.	ΤΟΞΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ
Β.37.	ΕΚ ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΟΞΕΙΑ ΕΚΘΕΣΗ
Β.38.	ΕΚ ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ — ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΔΟΣΗΣ 28 ΗΜΕΡΩΝ
Β.39.	ΔΟΚΙΜΗ ΜΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ DNA (UDS) ΜΕ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ *IN VIVO*
Β.40.	ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ (TER)
Β.40α.	ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

▼**B**

B.41.	ΔΟΚΙΜΗ ΦΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 3T3 NRU *IN VITRO*
B.42.	ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ
B.43.	ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ
B.44.	ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ: ΜΕΘΟΔΟΣ *IN VIVO*
B.45.	ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ: ΜΕΘΟΔΟΣ *IN VITRO*
B.46.	ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ IN VITRO: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΙΣΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ
B.47.	ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΑΔΙΑΦΑΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΒΟΟΕΙΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΣΧΥΡΩΝ ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ
B.48.	ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥΣ ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΣΧΥΡΩΝ ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ
B.49.	ΔΟΚΙΜΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ IN VITRO
B.50.	ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ: DA
B.51.	ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ: BRDU-ELISA

▼**M4**

B.52.	ΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ — ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΕΩΝ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

▼B

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗΣ ΟΥΣΙΑΣ

Η σύνθεση της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένων των κυριότερων προσμείξεων και οι σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητές της, συμπεριλαμβανομένης της σταθερότητας, πρέπει να είναι γνωστές πριν από την έναρξη οποιασδήποτε μελέτης τοξικότητας.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την επιλογή της οδού χορήγησης, τη σχεδίαση κάθε ιδιαίτερης μελέτης, το χειρισμό και τη φύλαξη της ελεγχόμενης ουσίας.

Η ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου γιο τον ποιοτικό Και ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας (συμπεριλαμβανομένων των κυριότερων προσμείξεων, εάν είναι δυνατόν) στο μέσο χορήγησης των δόσεων, καθώς επίσης και στο βιολογικό υλικό. θα πρέπει να προηγείται από την έναρξη της μελέτης.

Όλα τα στοιχεία σχετικά με την ταυτότητα, τις φυσικοχημικές ιδιότητες, την καθαρότητα και την συμπεριφορά της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να περιλαμβάνονται στην έκθεση της δοκιμής.

Β. ΦΡΟΝΤΙΔΑ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

Για τις δοκιμές τοξικότητας ουσιαστικός είναι ο αυστηρός έλεγχος των περιβαλλοντικών συνθηκών και οι κατάλληλες τεχνικές φροντίδας των πειραματόζωων.

i) *Συνθήκες στέγασης*

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες στους θαλάμους ή στα περιφράγματα θα πρέπει να είναι κατάλληλες για το κάθε είδος πειραματόζωου. Για τους επίμυες, τους ποντικούς και τα ινδικά χοιρίδια, κατάλληλες συνθήκες είναι η θερμοκρασία δωματίου 22 ± 3 ºC με σχετική υγρασία 30 % έως 70 % 7 για τα κουνέλια η θερμοκρασία πρέπει να είναι 20 ± 3 ºC με σχετική υγρασία 30 % έως 70 %.

Μερικές πειραματικές τελικές είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην επίδραση της θερμοκρασίας και, σ' αυτές τις περιπτώσεις, η περιγραφή της πειραματικής μεθόδου πρέπει να περιλαμβάνει και λεπτομέρειες για τις κατάλληλες συνθήκες. Σε όλες τις έρευνες για τις τοξικές επιδράσεις η θερμοκρασία και η υγρασία πρέπει να παρακολουθούνται, να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση της μελέτης.

Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος να αποτελείται από δώδεκα ώρες φωτός και δώδεκα ώρες σκότους. Λεπτομέρειες για τον προγραμματισμό της φωτοπεριόδου πρέπει να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση της μελέτης.

Εάν η μέθοδος δεν καθορίζει διαφορετικές συνθήκες, τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά ή σε μικρές ομάδες ζώων του ιδίου φύλου. Σε περίπτωση ομαδικής στέγασης, τα κλουβιά δεν πρέπει να περιέχουν περισσότερα από πέντε ζώα.

Στις εκθέσεις πειραμάτων με ζώα, είναι σημαντικό να αναφέρεται ο τύπος των χρησιμοποιουμένων κλουβιών και ο αριθμός των ζώων ανά κλουβί, τόσο κατά την περίοδο έκθεσης στη χημική ουσία όσο και κατά την μετέπειτα περίοδο των παρατηρήσεων.

▼B

ii) *Συνθήκες διατροφής*

Τα σιτηρέσια πρέπει να ανταποκρίνονται σε όλες τις διατροφικές απαιτήσεις του χρησιμοποιουμένου πειραματόζωου. Όταν οι ουσίες χορηγούνται στα ζώα μαζί με την τροφή τους. Η θρεπτική αξία του σιτηρεσίου μπορεί να ελαττωθεί λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ουσίας και των συστατικών της τροφής. Η δυνατότητα μιας τέτοιας αντίδρασης πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του πειράματος. Επιτρέπεται η χορήγηση συμβατικών εργαστηριακών σιτηρεσίων με χορήγηση απεριόριστης ποσότητας πόσιμου νερού. Η επιλογή του σιτηρεσίου μπορεί να εξαρτηθεί από την ανάγκη εξασφάλισης κατάλληλου δείγματος ελεγχόμενης ουσίας εφόσον αυτή χορηγείται με την εν λόγω μέθοδο.

Τροφικές προσμείξεις που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την τοξικότητα δεν πρέπει να περιέχονται στο σιτηρέσιο σε συγκεντρώσεις που θα επιτρέψουν παρεμβολή.

Γ. **ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ**

Η Ευρωπαϊκή Ένωση δεσμεύεται για την ανάπτυξη και την αξιολόγηση της εγκυρότητας εναλλακτικών τεχνικών που μπορούν να παρέχουν πληροφορίες του ιδίου επιπέδου με εκείνες που λαμβάνονται από τις τρέχουσες δοκιμές ου ζώου. χρησιμοποιώντας όπως μικρότερο αριθμό πειραματόζωων και προκαλώντας λιγότερη ταλαιπωρία ή αποφεύγοντας τη χρήση πειραματόζωων.

Τέτοιες μέθοδοι, εφόσον διατίθενται, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν είναι δυνατόν για τον χαρακτηρισμό του κινδύνου και την επακόλουθη ταξινόμηση και επισήμανση σε σχέση με τους εγγενείς κινδύνους.

Δ. **ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ**

Κατά την αξιολόγηση και ερμηνεία των δοκιμών, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι περιορισμοί στο βαθμό απ' ευθείας προέκτασης στον άνθρωπο των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τις δοκιμές *in vitro* σε ζώα και, εφόσον διατίθενται στοιχεία για δυσμενείς επιπτώσεις στον άνθρωπο, μπορεί να χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των δοκιμών.

Ε. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Οι περισσότερες από *τις* μεθόδους αυτές έχουν αναπτυχθεί στο πλαίσιο του προγράμματος του ΟΟΣΑ για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών και πρέπει να εφαρμόζονται σύμφωνα με τις αρχές ορθής εργαστηριακής πρακτικής ώστε να εξασφαλίζεται η ευρύτερη δυνατή «αμοιβαία αποδοχή των δεδομένων».

Περαιτέρω πληροφορίες μπορούν να αναζητηθούν στις παραπομπές των κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ καθώς και στην αλλού δημοσιευμένη σχετική βιβλιογραφία.

▼B

Β.1α. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ — ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΔΟΣΕΩΝ

1. Η ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντηρία γραμμή δοκιμών TG 420 (2001) του ΟΟΣΑ.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις κλασικές μεθόδους εκτίμησης της οξείας τοξικότητας, χρησιμοποιείται ως τελικό ο θάνατος των ζώων. Το 1984, η Βρετανική Τοξικολογική Εταιρεία πρότεινε μια νέα προσέγγιση των δοκιμών οξείας τοξικότητας, βασισμένη στη χορήγηση σειράς προκαθορισμένων δόσεων (1). Η προσέγγιση αυτή αποτρέπει τη χρήση του θανάτου των ζώων ως τελικού σημείου και αντί αυτού, στηρίζεται στην παρατήρηση σαφών συμπτωμάτων τοξικότητας σε ένα από μια σειρά προκαθορισμένων επιπέδων δόσης. Μετά τη διεξαγωγή μελετών ελέγχου της αξιοπιστίας, *in vivo,* συγκεκριμένα μίας στο Ηνωμένο Βασίλειο (2) και μίας δεύτερης σε διεθνή κλίμακα(3), η διαδικασία εγκρίθηκε ως μέθοδος δοκιμών το 1992. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκαν σε σειρά μελετών, με χρήση μαθηματικών μοντέλων, οι στατιστικές ιδιότητες της διαδικασίας σταθερής δόσης (4)(5)(6). Οι μελέτες *in vivo* σε συνδυασμό με τις μελέτες εκπόνησης μοντέλων έδειξαν ότι η διαδικασία διαθέτει επαναληπτικότητα, απαιτεί μικρότερο αριθμό ζώων και τους προκαλεί λιγότερες ταλαιπωρίες σε σύγκριση με τις κλασικές μεθόδους, Επίσης, παρέχει ανάλογες δυνατότητες ταξινόμησης των ουσιών με τις άλλες μεθόδους δοκιμών οξείας τοξικότητας.

Οδηγίες για την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου δοκιμών σε κάθε δεδομένη περίπτωση παρέχονται από το καθοδηγητικό έγγραφο «Guidance document on Acute Oral Toxicity Testing» (7), το οποίο περιέχει επίσης συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την εφαρμογή και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών Β.1δις.

Αποτελεί αρχή της μεθόδου η χρήση στην κυρίως μελέτη μόνο μετρίως τοξικών και η αποφυγή της χορήγησης δόσεων που προβλέπεται να είναι θανατηφόρες. Επίσης, δεν χρειάζεται να χορηγούνται δόσεις που είναι γνωστό ότι προκαλούν ισχυρούς πόνους και έντονη δυσφορία, εξαιτίας της διαβρωτικής ή πολύ ερεθιστικής δράσης των ουσιών. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που εμφανίζουν σαφή σημεία πόνου ή έντονης και διαρκούς δυσφορίας, θανατώνονται με ευθανασία και λαμβάνονται υπόψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και οι οδηγίες για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικείμενου θανάτου αποτελούν το αντικείμενο χωριστού καθοδηγητικού εγγράφου (8).

Η μέθοδος παρέχει στοιχεία για τις επικίνδυνες ιδιότητες των ουσιών και επιτρέπει την ιεράρχηση και την ταξινόμησή τους σύμφωνα με το Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης των χημικών ουσιών που προκαλούν οξεία τοξικότητα (GHS από τα αρχικά τον αγγλικού Globally Harmonised System) (9).

Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών τοξικότητας της ουσίας in vivo, τα τοξικολογικά δεδομένα του αφορούν ουσίες ανάλογης χημικής δομής, καθώς και την ή τις προβλεπόμενες χρήσεις της ουσίας. Οι πληροφορίες αυτές είναι απαραίτητες για να διασφαλίζεται ότι η διεξαγωγή της δοκιμής έχει ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου και βοηθούν στην εκλογή της κατάλληλης αρχικής δόσης.

▼B

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Οξεία τοξικότητα από το στόμα: οι δυσμενείς δράσεις που παρατηρούνται μετά τη χορήγηση από το στόμα μίας δόσης της ουσίας εφάπαξ ή πολλών δόσεων εντός 24ώρου.

Όψιμος θάνατος: η περίπτωση όπου ένα ζώο δεν πεθαίνει ούτε φαίνεται ετοιμοθάνατο εντός 48 ωρών, αλλά πεθαίνει αργότερα στη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης που διαρκεί 14 ημέρες.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας εκφράζεται σε βάρος ελεγχόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου (π.χ. mg/kg).

Έκδηλη τοξικότητα: γενικός όρος που δηλώνει την εμφάνιση σαφών συμπτωμάτων τοξικότητας μετά τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας [βλέπε παραδείγματα στη δημοσίευση (3)], ώστε να αναμένεται ότι η αμέσως υψηλότερη προκαθορισμένη δόση θα προκαλέσει είτε ισχυρό πόνο και διαρκή σημεία έντονης δυσφορίας ή κατάσταση ετοιμοθάνατου [τα σχετικά κριτήρια παρατίθενται στο καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)] ή πιθανή θνησιμότητα στα περισσότερα ζώα.

GHS: παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης για τις χημικές ουσίες και τα μίγματά τους. Πρόκειται για κοινή πρωτοβουλία του ΟΟΣΑ (υγεία του ανθρώπου και περιβάλλον), της Επιτροπής Εμπειρογνωμόνων για τις Μεταφορές Επικίνδυνων Εμπορευμάτων του ΟΗΕ (φυσικές και χημικές ιδιότητες) και της Διεθνούς Οργάνωσης Εργασίας (ανακοίνωση κινδύνων), με συντονιστή το Πρόγραμμα Διεθνών Οργανισμών για την ορθή Διαχείριση των Χημικών Προϊόντων (IOMC).

Επικείμενος θάνατος: η περίπτωση όπου αναμένεται κατάσταση ετοιμοθάνατου ή θάνατος πριν από τον επόμενο προγραμματισμένο χρόνο παρατήρησης. Μεταξύ των ενδείξεων επικείμενου θανάτου στα τρωκτικά περιλαμβάνονται οι σπασμοί, η πλάγια θέση, η κατάκλιση και ο τρόμος [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

LD_{50} **(διάμεσος θανατηφόρου δόσης):** η στατιστικά λαμβανόμενη τιμή εφάπαξ δόσης μιας ουσίας που αναμένεται να προκαλέσει το θάνατο του 50 % των πειραματόζωων, όταν χορηγηθεί από το στόμα. Η τιμή LD_{50} εκφράζεται σε βάρος ελεγχόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου (mg/kg).

Οριακή δόση: μια δόση που αποτελεί το ανώτατο όριο για τη δοκιμή (2 000 ή 5 000 mg/kg).

Κατάσταση ετοιμοθάνατου: η κατάσταση πολύ κοντά στο θάνατο ή η αδυναμία επιβίωσης ακόμη και μετά από θεραπευτική αγωγή [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

Προβλέψιμος θάνατος: η εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων που αποτελούν ένδειξη μελλοντικού θανάτου σε γνωστό χρόνο πριν από τον προγραμματισμένο τερματισμό του πειράματος, λόγου χάριν η αδυναμία του πειραματόζωου να φθάσει την τροφή ή το νερό [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

▼B

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Σε ομάδες ζώων του ίδιου φύλου χορηγούνται με βαθμιδωτή διαδικασία οι προκαθορισμένες δόσεις 5, 50, 300 και 2 000 mg/kg (κατ' εξαίρεση, μπορεί να προστεθεί η προκαθορισμένη δόση 5 000 mg/kg, βλέπε σημείο 1.6.2). Η αρχική δόση επιλέγεται με βάση τα αποτελέσματα αναγνωριστικής μελέτης ως η δόση εκείνη που αναμένεται να προκαλέσει κάποια συμπτώματα τοξικότητας, όχι όμως σοβαρές τοξικές επιδράσεις ή θνησιμότητα. Τα κλινικά συμπτώματα και οι παθολογικές καταστάσεις που συνοδεύονται από πόνο, ταλαιπωρίες και επικείμενο θάνατο περιγράφονται λεπτομερώς σε χωριστό καθοδηγητικό έγγραφο του ΟΟΣΑ (8). Ανάλογα με την εκδήλωση ή την απουσία συμπτωμάτων τοξικότητας ή θνησιμότητας, είναι δυνατόν να χορηγηθούν σε πρόσθετες ομάδες ζώων υψηλότερες ή χαμηλότερες προκαθορισμένες δόσεις. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι να προσδιοριστεί η δόση που προκαλεί έκδηλη τοξικότητα ή το θάνατο όχι περισσότερων του ενός ζώων ή διακόπτεται όταν δεν παρατηρούνται επιδράσεις στο ανώτατο επίπεδο δόσης ή η κατώτατη δόση προκαλεί θανάτους.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Επιλογή είδους ζώων**

Το προτιμώμενο είδος τρωκτικού είναι ο επίμυς, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη τρωκτικών. Κατά κανόνα χρησιμοποιούνται θηλυκά ζώα (7), επειδή από τη βιβλιογραφική έρευνα για τις συμβατικές δοκιμές LD_{50} προκύπτει ότι, αν και οι διαφορές ευπάθειας μεταξύ των δύο φύλων είναι συνήθως ελάχιστες, όταν παρατηρούνται διαφορές, τα θηλυκά ζώα είναι κατά κανόνα ελαφρώς πιο ευπαθή (10). Εάν ωστόσο οι γνώσεις σχετικά με τις τοξικολογικές ή τοξικοκινητικές ιδιότητες χημικών ουσιών με ανάλογη χημική δομή συνηγορούν υπέρ του ότι τα αρσενικά ζώα είναι πιθανώς πιο ευπαθή, τότε θα πρέπει να προτιμάται αυτό το φύλο. Όταν η δοκιμή διεξάγεται σε αρσενικά ζώα, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται επαρκώς.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα που ανήκουν σε φυλές κοινής εργαστηριακής χρήσης. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να μην έχουν ποτέ γεννήσει ούτε να εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, η ηλικία κάθε ζώου πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και το βάρος του να μην αποκλίνει περισσότερο από ± 20 % από το μέσο βάρος των ζώων στα οποία έχει ενδεχομένως χορηγηθεί η ουσία σε προηγούμενο στάδιο.

1.4.2 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12ωρο. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Τα ζώα μπορούν να τοποθετούνται ομαδικά σε κλουβιά κατά δόση, αλλά ο αριθμός ζώων σε κάθε κλουβί δεν πρέπει να παρεμποδίζει την ακριβή παρατήρηση του καθενός ζώου.

1.4.3 **Προετοιμασία των ζώων**

Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

▼B

1.4.4 **Παρασκευή των δόσεων**

Ο χορηγούμενος όγκος της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει κατά κανόνα να διατηρείται σταθερός σε όλη τη σειρά των δόσεων της δοκιμής με αλλαγή της συγκέντρωσης του χορηγούμενου παρασκευάσματος Όταν ωστόσο πρόκειται να ελεγχθεί ένα υγρό τελικό προϊόν ή μίγμα, η χρήση της ελεγχόμενης ουσίας χωρίς αραίωση, δηλαδή σε σταθερή συγκέντρωση, μπορεί να είναι πιο ενδεδειγμένη για τη μετέπειτα εκτίμηση των κινδύνων, ενώ αποτελεί και απαίτηση ορισμένων αρμόδιων για τις νομοθετικές ρυθμίσεις Αρχών. Σε κάθε περίπτωση, δεν επιτρέπεται υπέρβαση του μέγιστου όγκου χορηγούμενης δόσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Στα τρωκτικά, ο όγκος δεν πρέπει κατά κανόνα να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, αλλά στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων μπορεί να εξετασθεί το ενδεχόμενο χορήγησης 2 ml/100 g βάρους σώματος. Όσον αφορά τη μορφή του χορηγούμενου παρασκευάσματος, συνιστάται να χρησιμοποιούνται, κατά το δυνατόν, υδατικά διαλύματα/εναιωρήματα/γαλακτώματα, με δεύτερα κατά σειρά προτίμησης τα διαλύματα/εναιωρήματα/γαλακτώματα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τελευταία τα διαλύματα σε άλλους φορείς. Σε περίπτωση χρήσης άλλου φορέα πλην του νερού, πρέπει να είναι γνωστές οι τοξικολογικές ιδιότητές του. Οι δόσεις πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν από τη χορήγηση, εκτός εάν η σταθερότητα του παρασκευάσματος στο χρονικό διάστημα εντός του οποίου πρόκειται να χρησιμοποιηθεί είναι γνωστή και έχει κριθεί αποδεκτή.

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1 **Χορήγηση των δόσεων**

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται εφάπαξ με τη βοήθεια ρινογαστρικού καθετήρα σίτισης ή κατάλληλου σωλήνα διασωλήνωσης. Στη σπάνια περίπτωση όπου η εφάπαξ χορήγηση δεν είναι εφικτή, η δόση μπορεί να χορηγηθεί τμηματικά εντός περιόδου που δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες.

Πριν από τη χορήγηση των δόσεων, τα ζώα υποβάλλονται σε νηστεία (π.χ. διακοπή της σίτισης, αλλά όχι της παροχής νερού για όλη την προηγούμενη νύκτα, όταν χρησιμοποιούνται επίμυες, ή για 3-4 ώρες, όταν χρησιμοποιούνται ποντικοί). Μετά την περίοδο νηστείας, τα ζώα ζυγίζονται και τους χορηγείται η ελεγχόμενη ουσία. Η διακοπή της σίτισης μπορεί να συνεχιστεί και μετά τη χορήγηση της ουσίας για 3-4 ώρες, προκειμένου για επίμυες, ή 1-2 ώρες, προκειμένου για ποντικούς. Σε περίπτωση τμηματικής χορήγησης της δόσης εντός ορισμένου χρόνου, μπορεί να χρειαστεί να δοθεί στα ζώα τροφή και νερό, ανάλογα με τη διάρκεια του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος.

1.5.2 **Αναγνωριστική μελέτη**

Σκοπός της αναγνωριστικής μελέτης είναι να επιτρέψει την επιλογή της ενδεδειγμένης αρχικής δόσης για την κυρίως μελέτη. Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε μεμονωμένα ζώα σε διαδοχικά στάδια σύμφωνα με τα διαγράμματα ροής του παρατήματος 1. Η αναγνωριστική μελέτη τερματίζεται όταν μπορεί να ληφθεί απόφαση σχετικά με την αρχική δόση της κυρίως μελέτης (ή εάν η κατώτατη προκαθορισμένη δόση προκαλέσει θάνατο).

Η αρχική δόση της αναγνωριστικής μελέτης επιλέγεται μεταξύ των προκαθορισμένων επιπέδων 5, 50, 300 και 2 000 mg/kg ως η δόση που αναμένεται να προκαλέσει έκδηλη τοξικότητα, κατά το δυνατόν με βάση δεδομένα από μελέτες *in vivo* και *in vitro* με την ίδια ουσία ή με ουσίες ανάλογης χημικής δομής. Εάν δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία, η αρχική δόση είναι 300 mg/kg.

Τα διαδοχικά στάδια χορήγησης των δόσεων στο εκάστοτε ζώο πρέπει να απέχουν τουλάχιστον 24 ώρες. Όλα τα ζώα πρέπει να παρατηρούνται για 14 ημέρες τουλάχιστον.

▼B

Κατ' εξαίρεση, και μόνον εφόσον το επιβάλλουν συγκεκριμένες ανάγκες νομοθετικής ρύθμισης, μπορεί να εξεταστεί η χρήση ενός επιπλέον ανώτατου προκαθορισμένου επιπέδου δόσης 5 000 mg/kg (βλέπε παράρτημα 3). Για λόγους προστασίας των ζώων, η διεξαγωγή δοκιμών σε ζώα με δόσεις της κλίμακας που ορίζει την κατηγορία 5 του GHS (2 000-5 000 mg/kg) δεν συνιστάται και θα πρέπει να εξετάζεται μόνον εφόσον υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών να έχουν άμεση, ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας των ζώων ή του ανθρώπου ή για την προστασία του περιβάλλοντος.

Σε περίπτωση θανάτου ενός ζώου στο οποίο έχει χορηγηθεί η κατώτατη προκαθορισμένη δόση για την αναγνωριστική μελέτη (5 mg/kg), ο κανόνας είναι να τερματίζεται η μελέτη και η ουσία να κατατάσσεται στην κατηγορία 1 του GHS (όπως φαίνεται στο παράρτημα 1). Εάν ωστόσο απαιτείται επιβεβαίωση της ταξινόμησης, μπορεί να εφαρμοστεί η προαιρετική συμπληρωματική διαδικασία που ακολουθεί. Χορηγούνται 5 mg/kg σε ένα δεύτερο ζώο. Εάν αυτό πεθάνει, τότε επιβεβαιώνεται η κατάταξη στην κατηγορία 1 του GHS και η μελέτη τερματίζεται αμέσως. Εάν το δεύτερο ζώο επιζήσει, χορηγούνται 5 mg/kg σε τρία επιπλέον ζώα κατ' ανώτατο όριο. Επειδή υπάρχει πλέον μεγάλος κίνδυνος θνησιμότητας, η δόση θα πρέπει να χορηγείται διαδοχικά για να προστατεύονται τα ζώα. Το χρονικό διάστημα μεταξύ των διαδοχικών σταδίων χορήγησης της δόσης πρέπει να είναι επαρκές, ώστε να τεκμαίρεται ότι το προηγούμενο ζώο θα επιζήσει. Σε περίπτωση δεύτερου θανάτου, η ακολουθία χορήγησης της δόσης διακόπτεται αμέσως και δεν υποβάλλονται σε δοκιμή άλλα ζώα. Δεδομένου ότι ο δεύτερος θάνατος (ανεξαρτήτως του αριθμού των ζώων που είχαν υποβληθεί στη δοκιμή κατά το χρόνο τερματισμού) εμπίπτει στην έκβαση Α (2 ή περισσότεροι θάνατοι), εφαρμόζεται ο κανόνας ταξινόμησης του παραρτήματος 2 για την προκαθορισμένη δόση 5 mg/kg (κατάταξη στην κατηγορία 1, όταν διαπιστώνονται 2 ή περισσότεροι θάνατοι, ή στην κατηγορία 2, όταν διαπιστώνεται μόνον 1 θάνατος). Επιπλέον, το παράρτημα 4 παρέχει καθοδήγηση για την ταξινόμηση κατά το σύστημα της ΕΕ μέχρι να εφαρμοστεί το νέο GHS.

1.5.3 **Κυρίως μελέτη**

1.5.3.1 *Αριθμοί ζώων και επίπεδα δόσεων*

Το επόμενο βήμα μετά τη δοκιμή με την αρχική δόση υποδεικνύεται στα διαγράμματα ροής του παραρτήματος 2. Υπάρχουν οι εξής τρεις πιθανότητες: διακοπή της δοκιμής και κατάταξη στην ενδεδειγμένη κλάση κινδύνου ή δοκιμή με υψηλότερη προκαθορισμένη δόση ή δοκιμή με χαμηλότερη προκαθορισμένη δόση. Παρόλα αυτά, για λόγους προστασίας των ζώων, οι δόσεις που προκαλούν θανάτους κατά την αναγνωριστική μελέτη δεν χορηγούνται εκ νέου κατά την κυρίως μελέτη (βλέπε παράρτημα 2). Η πείρα δείχνει ότι το πιθανότερο αποτέλεσμα της δοκιμής με την αρχική δόση είναι η δυνατότητα ταξινόμησης της ουσίας, χωρίς να χρειάζονται άλλες δοκιμές.

Για κάθε επίπεδο δόσης που ελέγχεται, χρησιμοποιούνται κατά κανόνα πέντε ζώα του ίδιου φύλου. Η ομάδα των πέντε ζώων σχηματίζεται από το ζώο στο οποίο χορηγήθηκε το συγκεκριμένο επίπεδο δόσης κατά την αναγνωριστική μελέτη συν τέσσερα άλλα ζώα (εκτός εάν —σπάνια περίπτωση— ένα επίπεδο δόσης της κυρίως μελέτης δεν χορηγήθηκε στο πλαίσιο της αναγνωριστικής).

Το χρονικό διάστημα μεταξύ των δόσεων καθορίζεται ανάλογα με το χρόνο εκδήλωσης, τη διάρκεια και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων τοξικότητας. Η χορήγηση της επόμενης δόσης θα πρέπει να καθυστερεί μέχρις ότου είναι βέβαιο ότι τα ζώα που έλαβαν την προηγούμενη θα επιζήσουν. Συνιστάται να μεσολαβούν μεταξύ των δόσεων 3 ή 4 ημέρες, εάν χρειάζεται, ώστε να είναι δυνατόν να διαπιστωθούν οι όψιμες τοξικές επιδράσεις. Το χρονικό διάστημα μεταξύ των δόσεων μπορεί να αναπροσαρμόζεται ανάλογα με τις ανάγκες, λόγου χάριν στις περιπτώσεις αβέβαιης απόκρισης.

▼B

Όταν εξετάζεται η χρήση των 5 000 mg/kg ως ανώτατης προκαθορισμένης δόσης, πρέπει να εφαρμόζεται η διαδικασία που περιγράφεται στο παράρτημα 3 (βλέπε επίσης σημείο 1.6.2).

1.5.3.2 *Οριακή δοκιμή*

Η οριακή δοκιμή χρησιμοποιείται κυρίως στις περιπτώσεις όπου ο ερευνητής έχει στη διάθεσή του στοιχεία, από τα οποία προκύπτει ότι η ελεγχόμενη ουσία μάλλον δεν είναι τοξική, δηλαδή ότι έχει τοξικές επιδράσεις μόνον εάν ληφθεί σε δόσεις μεγαλύτερες από τις οριακές τιμές που προβλέπονται στις νομοθετικές ρυθμίσεις. Στοιχεία σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας είναι δυνατόν να συναχθούν από τα αποτελέσματα δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με ενώσεις, μίγματα ή προϊόντα ανάλογης χημικής δομής, λαμβάνοντας υπόψη την ταυτότητα και την εκατοστιαία αναλογία των σημαντικών από τοξικολογική άποψη συστατικών. Στις περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας ή εάν η τελευταία αναμένεται να είναι τοξική, πρέπει να διεξάγεται η κυρίως δοκιμή.

Μία αναγνωριστική μελέτη με αρχική δόση 2 000 mg/kg (ή κατ' εξαίρεση 5 000 mg/kg), ακολουθούμενη από τη χορήγηση της ίδιας δόσης σε τέσσερα επιπλέον ζώα, με εφαρμογή της συνήθους διαδικασίας, συνιστά οριακή δοκιμή για τους σκοπούς της παρούσας κατευθυντήριας γραμμής.

1.6 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Τα ζώα εξετάζονται το καθένα χωριστά τουλάχιστον μία φορά εντός των πρώτων 30 λεπτών από τη χορήγηση της ουσίας και τακτικά στη διάρκεια του πρώτου 24ώρου, με ιδιαίτερη προσοχή στις πρώτες 4 ώρες. Στη συνέχεια, εξετάζονται καθημερινά για 14 ημέρες συνολικά, εκτός εάν χρειαστεί να αποσυρθούν από τη μελέτη και να θανατωθούν με ευθανασία για να μην υποφέρουν ή εάν βρεθούν νεκρά. Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης δεν πρέπει πάντως να είναι αυστηρά καθορισμένη, αλλά να συναρτάται με τις τοξικές αντιδράσεις, το χρόνο εκδήλωσής τους και το χρόνο ανάρρωσης· συνεπώς, μπορεί να παρατείνεται, εφόσον κρίνεται απαραίτητο. Ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των συμπτωμάτων τοξικότητας έχει μεγάλη σημασία, ιδίως στις περιπτώσεις όπου αυτά τείνουν να εκδηλώνονται με καθυστέρηση (11). Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ζώο.

Εάν τα ζώα εξακολουθούν να παρουσιάζουν συμπτώματα τοξικότητας, απαιτούνται συμπληρωματικές παρατηρήσεις, μεταξύ των οποίων αλλαγές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, επίσης στη λειτουργία του αναπνευστικού και του κυκλοφοριακού συστήματος, του Κ.Ν.Σ και του αυτόνομου, καθώς και στη σωματική κινητικότητα και τη συμπεριφορά. Η προσοχή πρέπει να εστιάζεται στην παρατήρηση των σημείων τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, υπνηλίας, λήθαργου και κώματος. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι γενικές αρχές και τα κριτήρια που συνοψίζονται στο καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8). Τα ετοιμοθάνατα ζώα και όσα εμφανίζουν ισχυρούς πόνους ή διαρκή σημεία έντονης δυσφορίας θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία Ο χρόνος θανάτου των ζώων που θανατώνονται για να μην υποφέρουν ή βρίσκονται νεκρά θα πρέπει να σημειώνεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

1.6.1 **Βάρος σώματος**

Το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετριέται λίγο πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και, μετά, τουλάχιστον ανά εβδομάδα. Πρέπει να υπολογίζονται οι αλλαγές βάρους και να καταγράφονται. Στο τέλος της δοκιμής, τα ζώα που έχουν επιζήσει ζυγίζονται και έπειτα θανατώνονται με ευθανασία·.

▼B

1.6.2 **Παθολογία**

Σε όλα τα ζώα της δοκιμής (συμπεριλαμβανομένων εκείνων που πεθαίνουν στη διάρκεια της μελέτης ή αποσύρονται από τη μελέτη για να μην υποφέρουν τα ζώα) πρέπει να διενεργείται νεκροψία-νεκροτομία. Για κάθε ζώο, πρέπει να καταγράφονται όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις. Στα ζώα που επιζούν 24 ή περισσότερες ώρες μετά τη χορήγηση της πρώτης δόσης, μπορεί επιπλέον να πραγματοποιείται μικροσκοπική εξέταση των οργάνων που εμφανίζουν μακροσκοπικώς παθολογικές αλλοιώσεις, καθώς από την εξέταση αυτή ενδέχεται να προκύψουν χρήσιμα στοιχεία.

2 **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Πρέπει να παρέχονται τα δεδομένα για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, το σύνολο των δεδομένων πρέπει να συνοψίζεται σε πίνακα, όπου θα εμφαίνονται, για κάθε ομάδα της δοκιμής, ο αριθμός ζώων που χρησιμοποιήθηκαν, ο αριθμός ζώων που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, ο αριθμός ζώων που βρέθηκαν νεκρά στη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην υποφέρουν, ο χρόνος θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και εξέλιξη των τοξικών επιδράσεων και κατά πόσον ήταν ανατάξιμες, καθώς και τα ευρήματα από τη νεκροψία.

3 **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1 ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, εφόσον έχει σημασία, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης)·

— στοιχεία ταυτότητας, μεταξύ των οποίων τον αριθμό CAS.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής άλλου φορέα εκτός από νερό.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε·

— μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή·

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων (όπου συμπεριλαμβάνεται, κατά περίπτωση, αιτιολόγηση της χρήσης αρσενικών αντί θηλυκών ζώων)·

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κλπ..

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της φυσικής κατάστασης στην οποία χορηγήθηκε·

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση των δόσεων, συμπεριλαμβανομένων των όγκων τους και του χρόνου χορήγησης·

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού)·

— αιτιολόγηση της επιλογής της αρχικής δόσης.

▼B

Αποτελέσματα:

— πίνακα με τα δεδομένα απόκρισης και τα επίπεδα δόσης για κάθε ζώο (δηλ. ζώα που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των επιδράσεων)·

— πίνακα με τα βάρη των ζώων και τις μεταβολές τους·

— για κάθε ζώο, βάρος την ημέρα χορήγησης της δόσης, κατόπιν ανά εβδομάδα και, τέλος, κατά το χρόνο θανάτου ή θανάτωσης·

— ημερομηνία και ώρα θανάτου, εάν επήλθε νωρίτερα από την προγραμματισμένη θανάτωση·

— για κάθε ζώο, το χρόνο εκδήλωσης και την εξέλιξη των συμπτωμάτων τοξικότητας, καθώς και το κατά πόσον αυτά ήταν ανατάξιμα·

— για κάθε ζώο, ευρήματα από τη νεκροψία και την ιστολογική εξέταση, εφόσον υπάρχουν.

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4 **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P.-(1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure.-Hum. . Exp. Toxicol., 21,183-196.

(7) ΟΟΣΑ (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris

(8) ΟΟΣΑ (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

▼B

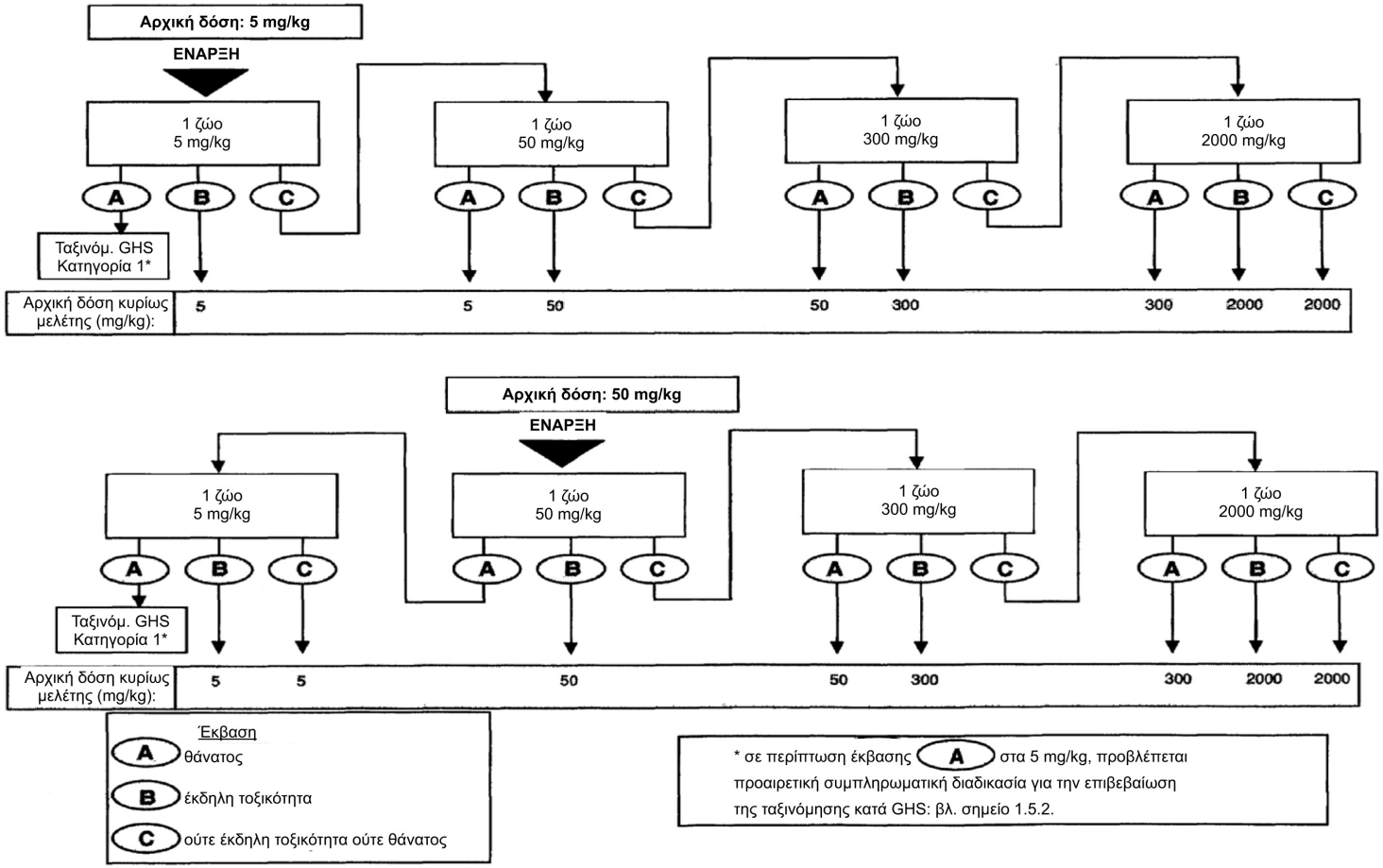
(9) ΟΟΣΑ (1998) Εναρμονισμένο Ολοκληρωμένο Σύστημα Ταξινόμησης Κινδύνων για τις Επιδράσεις των Χημικών Ουσιών στην Υγεία του ανθρώπου και στο Περιβάλλον, το οποίο εγκρίθηκε από την 28η κοινή συνεδρίαση της επιτροπής χημικών προϊόντων και της ομάδας εργασίας για τα χημικά προϊόντα, το Νοέμβριο του 1998, Μέρος 2, σ. 11 [http://webnetl .oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

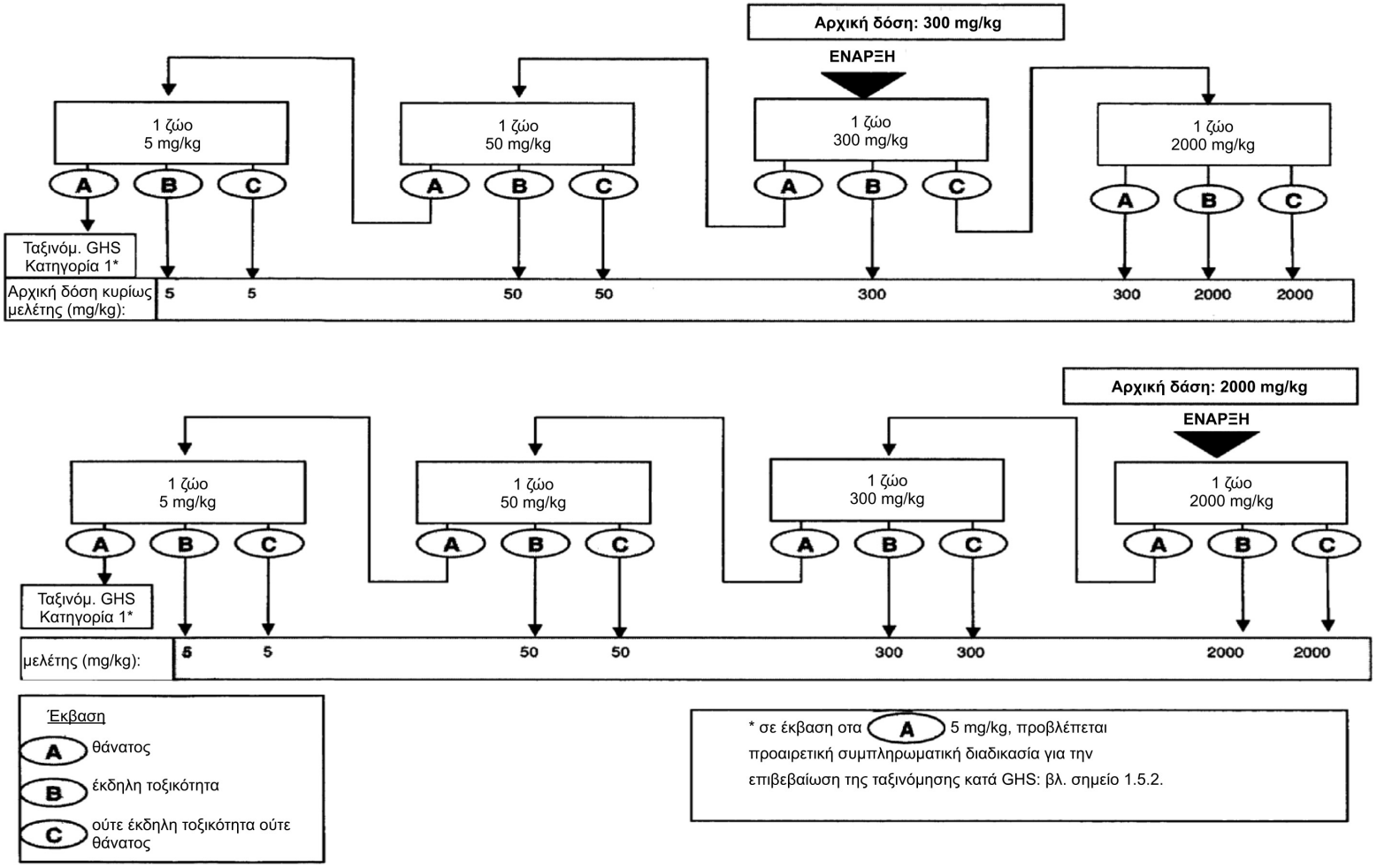
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation . In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1:

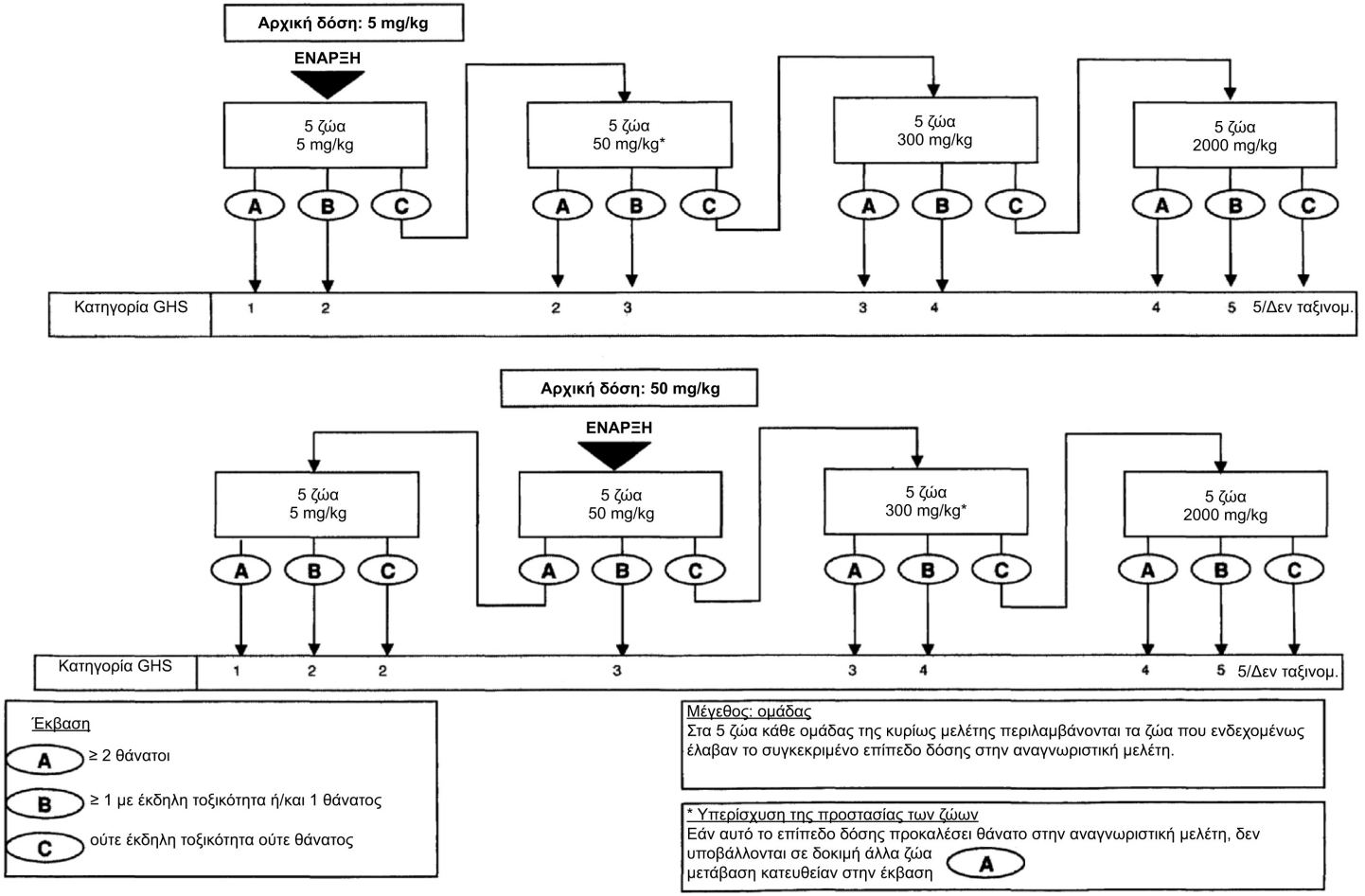
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

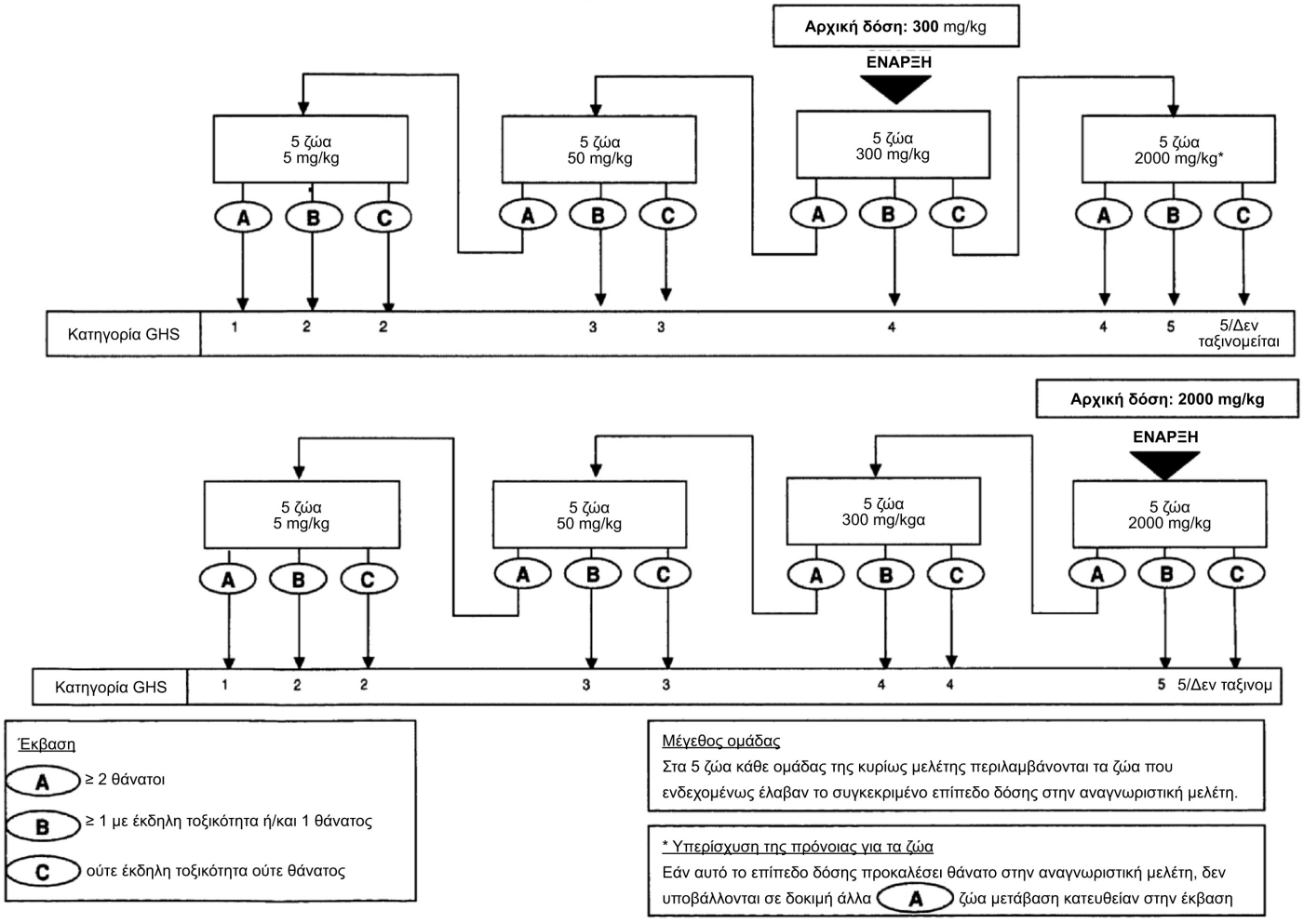



Αρχική δόση: 300 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
1 ζώο 5 mg/kg
1 ζώο 50 mg/kg
1 ζώο 300 mg/kg
1 ζώο 2000 mg/kg
A B C
Ταξινόμ. GHS Κατηγορία 1*
Αρχική δόση κυρίως μελέτης (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Αρχική δάση: 2000 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
1 ζώο 5 mg/kg
1 ζώο 50 mg/kg
1 ζώο 300 mg/kg
1 ζώο 2000 mg/kg
A B C
Ταξινόμ. GHS Κατηγορία 1*
μελέτης (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Έκβαση
A θάνατος
B έκδηλη τοξικότητα
C ούτε έκδηλη τοξικότητα ούτε θάνατος
* σε έκβαση οτα A 5 mg/kg, προβλέπεται προαιρετική συμπληρωματική διαδικασία για την επιβεβαίωση της ταξινόμησης κατά GHS: βλ. σημείο 1.5.2.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΡΙΩΣ ΜΕΛΕΤΗ




Αρχική δόση: 300 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
5 ζώα
5 mg/kg
5 ζώα
50 mg/kg
5 ζώα
300 mg/kg
5 ζώα
2000 mg/kg*
A
B
C
Κατηγορία GHS
1
2
2
3
3
4
4
5
5/Δεν ταξινομείται
Αρχική δόση: 2000 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
5 ζώα
5 mg/kg
5 ζώα
50 mg/kg
5 ζώα
300 mg/kga
5 ζώα
2000 mg/kg
Κατηγορία GHS
1
2
2
3
3
4
4
5
5/Δεν ταξινομ
Έκβαση
A ≥ 2 θάνατοι
B ≥ 1 με έκδηλη τοξικότητα ή/και 1 θάνατος
C ούτε έκδηλη τοξικότητα ούτε θάνατος
Μέγεθος ομάδας
Στα 5 ζώα κάθε ομάδας της κυρίως μελέτης περιλαμβάνονται τα ζώα που ενδεχομένως έλαβαν το συγκεκριμένο επίπεδο δόσης στην αναγνωριστική μελέτη.
* Υπερίσχυση της πρόνοιας για τα ζώα
Εάν αυτό το επίπεδο δόσης προκαλέσει θάνατο στην αναγνωριστική μελέτη, δεν υποβάλλονται σε δοκιμή άλλα A ζώα μετάβαση κατευθείαν στην έκβαση

▼B

Παραρτημα 3

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΩΝ ΟΠΟΙΩΝ ΟΙ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ LD_{50} ΥΠΕΡΒΑΙΝΟΥΝ ΤΑ 2 000 mg/kg, ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΝΑ ΔΙΕΞΑΧΘΟΥΝ ΔΟΚΙΜΕΣ

Σκοπός των κριτηρίων ταξινόμησης στην κατηγορία κινδύνου 5 είναι να επιτρέψουν την ταυτοποίηση ελεγχόμενων ουσιών που ενέχουν σχετικά χαμηλό κίνδυνο οξείας τοξικότητας, αλλά σε ορισμένες περιστάσεις ενδέχεται να είναι επικίνδυνες για ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού. Η τιμή LD_{50} από το στόμα ή το δέρμα για τις ουσίες αυτές αναμένεται να περιλαμβάνεται στη περιοχή τιμών 2 000-5 000 mg/kg ή ισοδύναμων δόσεων, προκειμένου για άλλες οδούς έκθεσης. Μια ελεγχόμενη ουσία θα μπορούσε να ταξινομηθεί στην κατηγορία κινδύνου που ορίζεται από: το εύρος 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (κατηγορία 5 κατά GHS) στις ακόλουθες περιπτώσεις:

α) εάν κάποιο από τα σχήματα δοκιμών του παραρτήματος 2 κατευθύνει προς την κατηγορία αυτή με βάση τη συχνότητα θανάτων·

β) εάν υπάρχουν ήδη αξιόπιστα στοιχεία που δείχνουν ότι η τιμή LD_{50} περιλαμβάνεται στη περιοχή τιμών της κατηγορίας 5 ή εάν τα αποτελέσματα άλλων μελετών σε ζώα ή παρατηρήσεις τοξικών επιδράσεων στον άνθρωπο δημιουργούν ανησυχίες για οξείες βλάβες στην υγεία του ανθρώπου.

γ) εάν μετά από παρέκταση δεδομένων, υπολογισμούς κατά προσέγγιση ή μετρήσεις δεν δικαιολογείται η ταξινόμηση σε ανώτερη κατηγορία κινδύνου και

— υπάρχουν αξιόπιστα στοιχεία που δείχνουν σοβαρές τοξικές επιδράσεις στον άνθρωπο ή

— έχει παρατηρηθεί θνησιμότητα σε δοκιμές από το στόμα με επίπεδα δόσεων έως και της κατηγορίας 4 ή

— οι απόψεις των ειδικών επιβεβαιώνουν σοβαρά κλινικά συμπτώματα τοξικότητας —εκτός από διάρροια, ανόρθωση του τριχώματος και ταλαιπωρημένη εμφάνιση— που έχουν παρατηρηθεί σε δοκιμές με επίπεδα δόσεων έως και της κατηγορίας 4 ή

— οι απόψεις των ειδικών επιβεβαιώνουν αξιόπιστες ενδείξεις πιθανής σοβαρής, οξείας τοξικής επίδρασης, οι οποίες έχουν προκύψει από άλλες μελέτες σε ζώα.

ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΔΟΣΕΙΣ ΑΝΩ ΤΩΝ 2 000 mg/kg

Κατ' εξαίρεση και μόνον εφόσον το επιβάλλουν συγκεκριμένες ανάγκες κανονιστικής ρύθμισης, μπορεί να εξεταστεί η χρήση ενός επιπλέον ανώτατου προκαθορισμένου επιπέδου δόσης 5 000 mg/kg. Για λόγους προστασίας των ζώων, η διεξαγωγή δοκιμών με δόση 5 000 mg/kg δεν συνιστάται και θα πρέπει να εξετάζεται μόνον εφόσον υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών να έχουν άμεση, ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας των ζώων ή του ανθρώπου (9).

Αναγνωριστική μελέτη

Οι κανόνες που διέπουν τη λήψη απόφασης στη διαδοχική διαδικασία του παραρτήματος 1 διευρύνονται, ώστε να συμπεριλάβουν το επίπεδο δόσης 5 000 mg/kg. Συνεπώς, η έκβαση Α (θάνατος) σε αναγνωριστική μελέτη με αρχική δόση 5 000 mg/kg απαιτεί την υποβολή δεύτερου ζώου σε δοκιμή με 2 000 mg/kg, ενώ η έκβαση Β ή Γ (έκδηλη τοξικότητα ή απουσία τοξικότητας) επιτρέπει την επιλογή των 5 000 mg/kg ως αρχικής δόσης για την κυρίως μελέτη. Ομοίως, εάν χρησιμοποιηθεί άλλη αρχική δόση πλην των 5 000 mg/kg, τότε διεξάγεται δοκιμή με 5 000 mg/kg, εφόσον η έκβαση στο επίπεδο 2 000 mg/kg είναι Β ή Γ. Στη συνέχεια, η έκβαση Α στο επίπεδο 5 000 mg/kg υπαγορεύει τη διεξαγωγή κυρίως μελέτης με αρχική δόση 2 000 mg/kg, ενώ η έκβαση Β ή Γ τη χρήση αρχικής δόσης 5 000 mg/kg στη μελέτη αυτή.

▼B

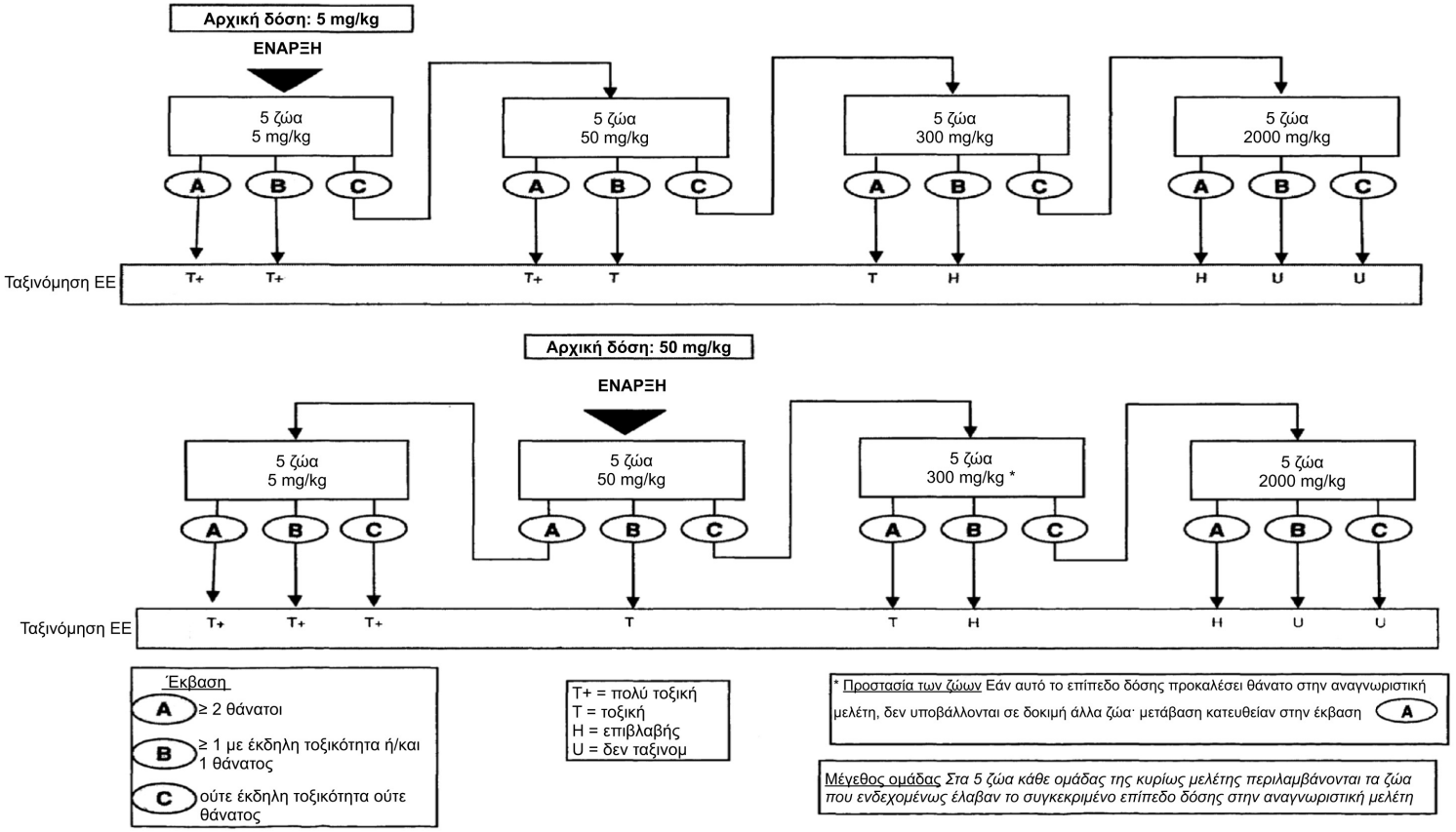
Κυρίως μελέτη

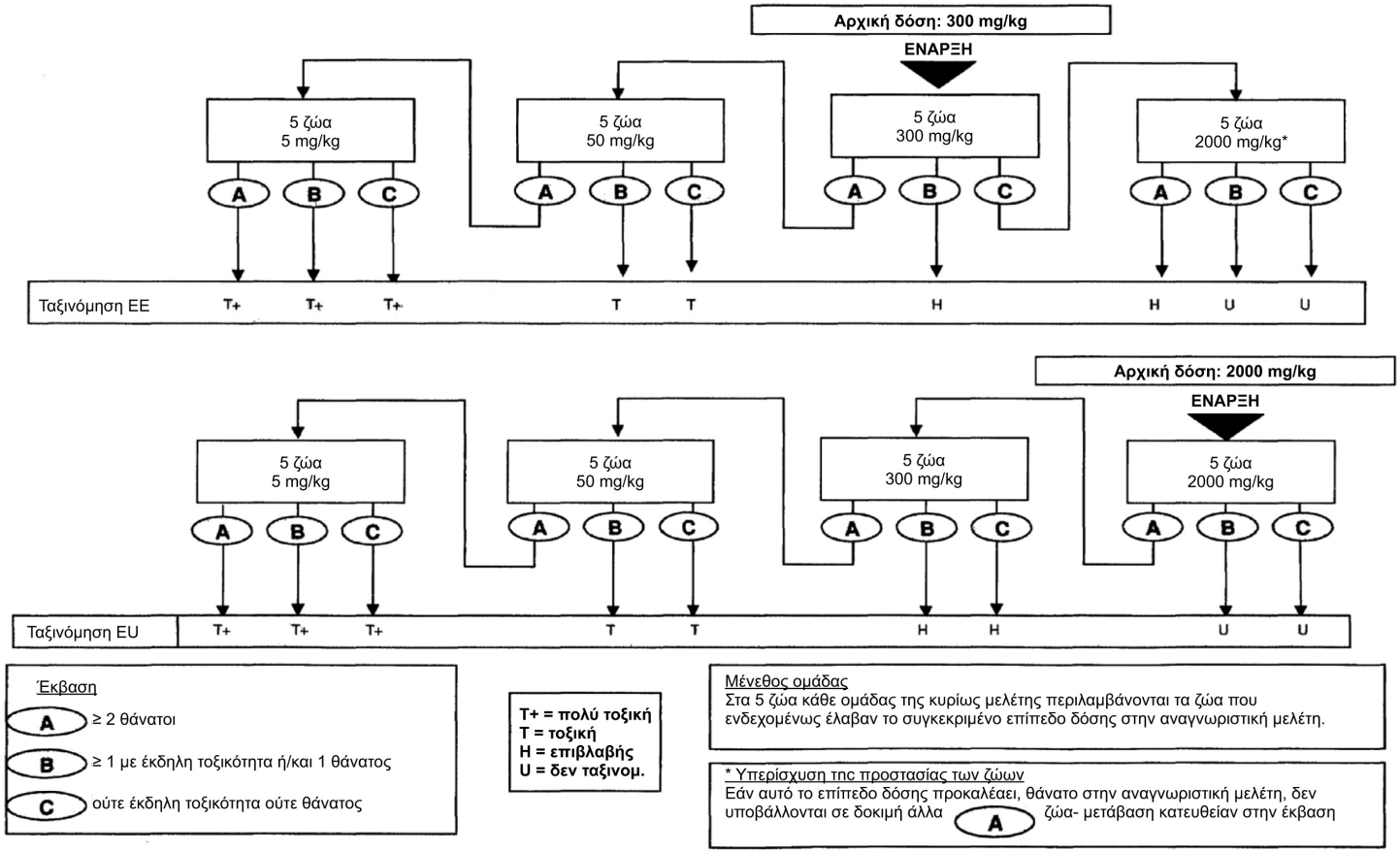
Οι κανόνες που διέπουν τη λήψη απόφασης στη διαδοχική διαδικασία του παραρτήματος 2 διευρύνονται, ώστε να συμπεριλάβουν το επίπεδο δόσης 5 000 mg/kg. Συνεπώς, η έκβαση Α (> 2 θάνατοι) σε κυρίως μελέτη με αρχική δόση 5 000 mg/kg απαιτεί την υποβολή δεύτερης ομάδας σε δοκιμή με 2 000 mg/kg, ενώ η έκβαση Β (έκδηλη τοξικότητα ή/και < 1 θάνατος) ή Γ (απουσία τοξικότητας) συνεπάγεται ότι η ουσία δεν ταξινομείται κατά GHS. Ομοίως, εάν χρησιμοποιηθεί άλλη αρχική δόση πλην των 5 000 mg/kg, τότε διεξάγεται δοκιμή με 5 000 mg/kg εφόσον η έκβαση στο επίπεδο 2 000 mg/kg είναι Γ. Στη συνέχεια, η έκβαση Α στο επίπεδο 5 000 mg/kg συνεπάγεται ότι η ουσία ταξινομείται στην κατηγορία 5 του GHS, ενώ η έκβαση Β ή Γ ότι η ουσία δεν ταξινομείται σύμφωνα με το σύστημα αυτό.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ B.1.α

Οδηγίες για την ταξινόμηση σύμφωνα με το σύστημα της ΕΕ κατά τη μεταβατική περίοδο μέχρι να εφαρμοστεί πλήρως το παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης (GHS) [έχουν ληφθεί από τη δημοσίευση (8)]




Αρχική δόση: 300 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
5 ζώα 5 mg/kg
5 ζώα 50 mg/kg
5 ζώα 300 mg/kg
5 ζώα 2000 mg/kg*
A B C
Ταξινόμηση ΕΕ
T+ T+ T+ T T H H U U
Αρχική δόση: 2000 mg/kg
ΕΝΑΡΞΗ
5 ζώα 5 mg/kg
5 ζώα 50 mg/kg
5 ζώα 300 mg/kg
5 ζώα 2000 mg/kg
Ταξινόμηση EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Έκβαση
A ≥ 2 θάνατοι
B ≥ 1 με έκδηλη τοξικότητα ή/και 1 θάνατος
C ούτε έκδηλη τοξικότητα ούτε θάνατος
T+ = πολύ τοξική
T = τοξική
H = επιβλαβής
U = δεν ταξινομ.
Μένεθος ομάδας
Στα 5 ζώα κάθε ομάδας της κυρίως μελέτης περιλαμβάνονται τα ζώα που ενδεχομένως έλαβαν το συγκεκριμένο επίπεδο δόσης στην αναγνωριστική μελέτη.
* Υπερίσχυση της προστασίας των ζώων
Εάν αυτό το επίπεδο δόσης προκαλέσει, θάνατο στην αναγνωριστική μελέτη, δεν υποβάλλονται σε δοκιμή άλλα ζώα- μετάβαση κατευθείαν στην έκβαση A

▼B

Β.1β. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ — ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΕΩΝ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

1. Η ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη την κατευθυντήρια γραμμή TG 423 (2001) του ΟΟΣΑ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος των οξείας τοξικότητας (1) που περιγράφεται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή συνίσταται σε μια βαθμιδωτή διαδικασία, σε κάθε στάδιο της οποίας χρησιμοποιούνται 3 ζώα του ίδιου φύλου. Για να είναι δυνατόν να κριθεί η οξεία τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας, χρειάζονται κατά μέσον όρο 2.4 βαθμίδες, ανάλογα με τη θνησιμότητα ή/και την κατάσταση ετοιμοθάνατων των ζώων. Η διαδικασία διαθέτει επαναληπτικότητα, απαιτεί πολύ μικρό αριθμό ζώων και παρέχει ανάλογες δυνατότητες ταξινόμησης των ουσιών με τις άλλος μεθόδους δοκιμών οξείας τοξικότητας. Η μέθοδος των κλάσεων οξείας τοξικότητας βασίζεται σε βιομετρικές αξιολογήσεις (2) (3) (4) (5) με χρήση καθορισμένων δόσεων, οι οποίες διαφέρουν επαρκώς μεταξύ τους, ώστε να επιτρέπουν την ιεράρχηση των ελεγχόμενων ουσιών για τους σκοπούς της ταξινόμησης και της εκτίμησης κινδύνου. Η μέθοδος, του υιοθετήθηκε το 1996, αποτέλεσε αντικείμενο διεξοδικών μελετών ελέγχων της αξιοπιστίας *in vivo,* τόσο σε εθνική (6) όσο και σε διεθνή κλίμακα (7), έναντι δεδομένων σχετικών με την LD_{50} που ελήφθησαν από τη βιβλιογραφία.

Οδηγίες για την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου δοκιμών σε κάθε δεδομένη περίπτωση παρέχονται από το καθοδηγητικό έγγραφο «Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing» (8), το οποίο περιέχει επίσης συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την εφαρμογή και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών Β.1β.

Δεν απαιτείται να χορηγούνται οι ελεγχόμενες ουσίες σε δόσεις που είναι γνωστό ότι προκαλούν ισχυρούς πόνους και έντονη δυσφορία, εξαιτίας της διαβρωτικής ή πολύ ερεθιστικής δράσης των ουσιών. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν σαφή σημεία πόνου ή έντονης και διαρκούς δυσφορίας, θανατώνονται με ευθανασία και λαμβάνονται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων με τον ίδιο τρόπο όπως τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη δοκιμή. Τα κριτήρια για τη λήψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και οι οδηγίες για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικειμένου θανάτου, αποτελούν το αντικείμενο χωριστού καθοδηγητικού εγγράφου (9).

Στη μέθοδο χρησιμοποιούνται προκαθορισμένες δόσεις, ενώ τα αποτελέσματα της επιτρέπουν την ιεράρχηση και την ταξινόμηση των ουσιών σύμφωνα με το Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης των χημικών ουσιών που προκαλούν οξεία τοξικότητα (10).

Η μέθοδος αυτή δεν έχει μελετηθεί, καταρχήν, για να επιτρέπει του ακριβή υπολογισμό της LD_{50} μόνον στις περιπτώσεις όπου δύο τουλάχιστον δόσεις έχουν ως αποτέλεσμα θνησιμότητα μεγαλύτερη από 0 % και μικρότερη από 100 %. Η χρήση επιλεγμένων προκαθορισμένων δόσεων, ανεξαρτήτως της ελεγχόμενης ουσίας, σε συνδυασμό με τη ρητή σύνδεση της ταξινόμησης με τον αριθμό των ζώων του διαπιστώνεται ότι βρίσκονται σε μια σειρά διαφορετικών καταστάσεων, βελτιώνει τη συνέπεια των εκθέσεων δοκιμής την επαναληπτικότητα της μεθόδου μεταξύ των εργαστηρίων.

▼B

Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών της ουσίας *in vitro* ή *in vivo,* τα τοξικολογικά δεδομένα του αφορούν ουσίες ανάλογης χημικής δομής, καθώς και την ή τις προβλεπόμενες χρήσεις, της ουσίας. Οι πληροφορίες αυτές είναι απαραίτητες για να διασφαλίζεται ότι η διεξαγωγή της δοκιμής έχει ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου και βοηθούν στην επιλογή της καταλληλότερης αρχικής δόσης.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Οξεία τοξικότητα από το στόμα: οι δυσμενείς επιδράσεις που παρατηρούνται μετά τη χορήγηση από το στόμα μίας δόσης της ουσίας εφάπαξ ή πολλών δόσεων εντός 24ώρου.

Όψιμος θάνατος: η περίπτωση όπου ένα ζώο δεν πεθαίνει ούτε είναι ετοιμοθάνατο εντός 48 ωρών, αλλά πεθαίνει αργότερα στη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης, που διαρκεί 14 ημέρες.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας· εκφράζεται σε βάρος ελεγχόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου (π.χ. mg/kg).

GHS: παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης για τις χημικές ουσίες και τα μίγματά τους. Πρόκειται για κοινή πρωτοβουλία του ΟΟΣΑ (υγεία του ανθρώπου και περιβάλλον), της Επιτροπής Εμπειρογνωμόνων για τις Μεταφορές Επικίνδυνων Εμπορευμάτων του ΟΗΕ (φυσικές και χημικές ιδιότητες) και της Διεθνούς Οργάνωσης Εργασίας (ανακοίνωση κινδύνων), με συντονιστή το Πρόγραμμα Διεθνών Οργανισμών για την ορθή Διαχείριση των Χημικών Προϊόντων (IOMC).

Επικείμενος θάνατος: η περίπτωση όπου αναμένεται κατάσταση ετοιμοθάνατου ή θάνατος πριν από τον επόμενο προγραμματισμένο χρόνο παρατήρησης. Μεταξύ των ενδείξεων επικείμενου θανάτου στα τρωκτικά περιλαμβάνονται οι σπασμοί, η πλάγια θέση, η κατάκλιση και ο τρόμος [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

LD_{50} (διάμεσος θανατηφόρου δόσης): η στατιστικά λαμβανόμενη τιμή εφάπαξ δόσης μιας ουσίας που αναμένεται να προκαλέσει το θάνατο του 50 % των πειραματόζωων, όταν χορηγηθεί από το στόμα. Η τιμή LD_{50} εκφράζεται σε βάρος ελεγχόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου (mg/kg).

Οριακή δόση: μια δόση που αποτελεί το ανώτατο όριο για τη δοκιμή (2 000 ή 5 000 mg/kg).

Κατάσταση ετοιμοθάνατου: η κατάσταση πολύ κοντά στο θάνατο ή η αδυναμία επιβίωσης ακόμη και μετά από θεραπευτική αγωγή [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

Προβλέψιμος θάνατος: η εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων που αποτελούν ένδειξη μελλοντικού θανάτου σε γνωστό χρόνο πριν από τον προγραμματισμένο τερματισμό του πειράματος, λόγου χάριν η αδυναμία του πειραματόζωου να φθάσει την τροφή ή το νερό [για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (8)].

▼B

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η αρχή της μεθόδου συνίσταται στη συγκέντρωση επαρκών στοιχείων για την οξεία τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας, ώστε να είναι δυνατή η ταξινόμηση της, με βαθμιδωτή διαδικασία, σε κάθε στάδιο της οποίας χρησιμοποιείται ο ελάχιστος δυνατός αριθμός ζώων. Μία από τις προκαθορισμένες δόσεις ουσίας χορηγείται από το στόμα σε ομάδα πειραματόζωων. Η διαδικασία δοκιμής είναι βαθμιδωτή και σε κάθε στάδιό της χρησιμοποιούνται τρία ζώα του ίδιου φύλου (συνήθως θηλυκά). Η απουσία ή παρουσία θνησιμότητας των ζώων συνδεόμενης με την ουσία σε μια δεδομένη βαθμίδα, καθορίζει ποια θα είναι η επόμενη, δηλαδή:

— δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές,

— χορήγηση της ίδιας δόσης σε τρία επιπλέον ζώα,

— χορήγηση της αμέσως υψηλότερης ή χαμηλότερης δόσης σε τρία επιπλέον ζώα.

Οι λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμών παρατίθενται στο παράρτημα 1. Η μέθοδος επιτρέπει τη λήψη απόφασης σχετικά με την κατάταξη της ελεγχόμενης ουσίας σε μία από μια σειρά κλάσεων τοξικότητας, οι οποίες ορίζονται από καθορισμένες κρίσιμες τιμές LD_{50}.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Επιλογή είδους ζώων**

Το προτιμώμενο είδος τρωκτικού είναι ο επίμυς, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη τρωκτικών. Κατά κανόνα χρησιμοποιούνται θηλυκά ζώα (7), επειδή από τη βιβλιογραφική έρευνα για τις συμβατικές δοκιμές LD_{50} προκύπτει ότι, αν και οι διαφορές ευπάθειας μεταξύ των δύο φύλων είναι συνήθως ελάχιστες, όταν παρατηρούνται διαφορές, τα θηλυκά ζώα είναι κατά κανόνα ελαφρώς πιο ευπαθή (10). Εάν ωστόσο οι γνώσεις σχετικά με τις τοξικολογικές ή τοξικοκινητικές ιδιότητες χημικών ουσιών με ανάλογη χημική δομή συνηγορούν υπέρ του ότι τα αρσενικά ζώα είναι πιθανώς πιο ευπαθή, τότε θα πρέπει να προτιμάται αυτό το φύλο. Όταν η δοκιμή διεξάγεται σε αρσενικά ζώα, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται επαρκώς.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα που ανήκουν σε φυλές κοινής εργαστηριακής χρήσης. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να μην έχουν ποτέ γεννήσει ούτε να εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, η ηλικία κάθε ζώου πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και το βάρος του να μην αποκλίνει περισσότερο από ± 20 % από το μέσο βάρος των ζώων στα οποία έχει ενδεχομένως χορηγηθεί η ουσία σε προηγούμενο στάδιο.

1.4.2 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12ωρο. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Τα ζώα μπορούν να τοποθετούνται ομαδικά σε κλουβιά κατά δόση, αλλά ο αριθμός ζώων σε κάθε κλουβί δεν πρέπει να παρεμποδίζει την ακριβή παρατήρηση του καθενός ζώου.

▼B

1.4.3 **Προετοιμασία των ζώων**

Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

1.4.4 **Παρασκευή των δόσεων**

Ο χορηγούμενος όγκος της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει κατά κανόνα να διατηρείται σταθερός σε όλη τη σειρά των δόσεων της δοκιμής με αλλαγή της συγκέντρωσης του χορηγούμενου παρασκευάσματος Όταν ωστόσο πρόκειται να ελεγχθεί ένα υγρό τελικό προϊόν ή μίγμα, η χρήση της ελεγχόμενης ουσίας χωρίς αραίωση, δηλαδή σε σταθερή συγκέντρωση, μπορεί να είναι πιο ενδεδειγμένη για τη μετέπειτα εκτίμηση των κινδύνων, ενώ αποτελεί και απαίτηση ορισμένων αρμόδιων για τις νομοθετικές ρυθμίσεις Αρχών. Σε κάθε περίπτωση, δεν επιτρέπεται υπέρβαση του μέγιστου όγκου χορηγούμενης δόσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Στα τρωκτικά, ο όγκος δεν πρέπει κατά κανόνα να υπερβαίνει το 1 ml/100g βάρους σώματος, αλλά στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο χορήγησης 2 ml/100g βάρους σώματος. Όσον αφορά τη μορφή του χορηγούμενου παρασκευάσματος, συνιστάται να χρησιμοποιούνται, κατά το δυνατόν, υδατικά διαλύματα/εναιωρήματα/γαλακτώματα, με δεύτερα κατά σειρά προτίμησης τα διαλύματα/εναιωρήματα/γαλακτώματα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τελευταία τα διαλύματα σε άλλους φορείς. Σε περίπτωση χρήσης άλλου φορέα πλην του νερού, πρέπει να είναι γνωστές οι τοξικολογικές ιδιότητές του. Οι δόσεις πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν από τη χορήγηση, εκτός εάν η σταθερότητα του παρασκευάσματος στο χρονικό διάστημα εντός του οποίου πρόκειται να χρησιμοποιηθεί είναι γνωστή και έχει κριθεί αποδεκτή.

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1 **Χορήγηση των δόσεων**

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται εφάπαξ με τη βοήθεια ρινογαστρικού καθετήρα σίτισης ή κατάλληλου σωλήνα διασωλήνωσης. Στη σπάνια περίπτωση όπου η εφάπαξ χορήγηση δεν είναι εφικτή, η δόση μπορεί να χορηγηθεί τμηματικά εντός περιόδου που δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες.

Πριν από τη χορήγηση των δόσεων, τα ζώα υποβάλλονται σε νηστεία (π.χ. διακοπή της σίτισης, αλλά όχι της παροχής νερού για όλη την προηγούμενη νύκτα, όταν χρησιμοποιούνται επίμυες, ή για 34 ώρες, όταν χρησιμοποιούνται ποντικοί). Μετά την περίοδο νηστείας, τα ζώα ζυγίζονται και τους χορηγείται η ελεγχόμενη ουσία. Η διακοπή της σίτισης μπορεί να συνεχιστεί και μετά τη χορήγηση της ουσίας για 3-4 ώρες, προκειμένου για επίμυες, ή 1-2 ώρες, προκειμένου για ποντικούς. Σε περίπτωση τμηματικής χορήγησης της δόσης εντός ορισμένου χρόνου, μπορεί να χρειαστεί να δοθεί στα ζώα τροφή και νερό, ανάλογα με τη διάρκεια του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος.

1.5.2 **Αριθμός ζώων και επίπεδα δόσεων**

Σε κάθε βαθμίδα χρησιμοποιούνται τρία ζώα. Η αρχική δόση επιλέγεται μεταξύ τεσσάρων προκαθορισμένων επιπέδων, που είναι τα 5, 50, 300 και 2 000 mg/kg βάρους σώματος. Η αρχική δόση θα πρέπει να είναι το επίπεδο με τις μεγαλύτερες πιθανότητες να προκαλέσει το θάνατο ορισμένων από τα ζώα στα οποία θα χορηγηθεί. Η διαδικασία που θα πρέπει να εφαρμόζεται για κάθε επίπεδο αρχικής δόσης εμφαίνεται στα διαγράμματα ροής του παραρτήματος 1. Επιπλέον, το παράρτημα 4 παρέχει καθοδήγηση για την ταξινόμηση κατά το σύστημα της ΕΕ μέχρι να εφαρμοστεί το νέο GHS.

▼B

Όταν από τα διαθέσιμα στοιχεία συνάγεται μικρή πιθανότητα θνησιμότητας στο υψηλότερο επίπεδο αρχικής δόσης (2 000 mg/kg βάρους σώματος), θα πρέπει να διεξάγεται οριακή δοκιμή. Εάν δεν υπάρχουν στοιχεία για την ουσία που πρόκειται να ελεγχθεί, συνιστάται να χρησιμοποιείται αρχική δόση 300 mg/kg βάρους σώματος για λόγους προστασίας των ζώων.

Το χρονικό διάστημα μεταξύ των δόσεων καθορίζεται με την έναρξη, τη διάρκεια και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων τοξικότητας. Η χορήγηση της επόμενης δόσης θα πρέπει να καθυστερεί μέχρις ότου είναι βέβαιο ότι τα ζώα που έλαβαν την προηγούμενη θα επιζήσουν.

Κατ' εξαίρεση, και μόνον εφόσον το επιβάλλουν συγκεκριμένες ανάγκες νομοθετικής ρύθμισης, μπορεί να εξεταστεί η χρήση ενός επιπλέον ανώτατου επιπέδου δόσης 5 000 mg/kg (βλέπε παράρτημα 2). Για λόγους προστασίας των ζώων, η διεξαγωγή δοκιμών σε ζώα με δόσεις της κλίμακας που ορίζει την κατηγορία 5 του GHS (2 000-5 000 mg/kg) δεν συνιστάται και θα πρέπει να εξετάζεται μόνον εφόσον υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών να έχουν άμεση, ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου ή των ζώων ή για την προστασία του περιβάλλοντος.

1.5.3 **Οριακή δοκιμή**

Η οριακή δοκιμή χρησιμοποιείται κυρίως στις περιπτώσεις όπου ο ερευνητής έχει στη διάθεσή του στοιχεία, από τα οποία προκύπτει ότι η ελεγχόμενη ουσία μάλλον δεν είναι τοξική, δηλαδή ότι έχει τοξικές επιδράσεις μόνον εάν ληφθεί σε δόσεις μεγαλύτερες από τις οριακές τιμές που προβλέπονται στις νομοθετικές ρυθμίσεις. Στοιχεία σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας είναι δυνατόν να συναχθούν από τα αποτελέσματα δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με ενώσεις, μίγματα ή προϊόντα ανάλογης χημικής δομής, λαμβάνοντας υπόψη την ταυτότητα και την εκατοστιαία αναλογία των σημαντικών από τοξικολογική άποψη συστατικών. Στις περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας ή εάν η τελευταία αναμένεται να είναι τοξική, πρέπει να διεξάγεται η κυρίως δοκιμή.

Μπορεί να διεξαχθεί οριακή δοκιμή με δόση 2 000 mg/kg βάρους σώματος σε έξι ζώα (τρία ανά βαθμίδα). Κατ' εξαίρεση, μπορεί να διεξαχθεί οριακή δοκιμή με δόση 5 000 mg/kg σε τρία ζώα (βλ. παράρτημα 2). Εάν διαπιστωθεί θνησιμότητα συνδεόμενη με την ελεγχόμενη ουσία, μπορεί να χρειαστεί να διεξαχθεί δοκιμή με το αμέσως χαμηλότερο επίπεδο δόσης.

1.6 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Τα ζώα εξετάζονται το καθένα χωριστά τουλάχιστον μία φορά εντός των πρώτων 30 λεπτών από τη χορήγηση της ουσίας και τακτικά στη διάρκεια του πρώτου 24ώρου, με ιδιαίτερη προσοχή στις πρώτες 4 ώρες. Στη συνέχεια, εξετάζονται καθημερινά για 14 ημέρες συνολικά, εκτός εάν χρειαστεί να αποσυρθούν από τη μελέτη και να θανατωθούν με ευθανασία για να μην υποφέρουν ή εάν βρεθούν νεκρά. Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης δεν πρέπει πάντως να είναι αυστηρά καθορισμένη, αλλά να συναρτάται με τις τοξικές αντιδράσεις, το χρόνο έναρξής τους και το χρόνο ανάρρωσης· συνεπώς, μπορεί να παρατείνεται, εφόσον κρίνεται απαραίτητο. Ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των συμπτωμάτων τοξικότητας έχει μεγάλη σημασία, ιδίως στις περιπτώσεις όπου αυτά τείνουν να εκδηλώνονται με καθυστέρηση (11). Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ζώο.

▼B

Εάν τα ζώα εξακολουθούν να παρουσιάζουν συμπτώματα τοξικότητας, απαιτούνται συμπληρωματικές παρατηρήσεις, μεταξύ των οποίων αλλαγές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, επίσης στη λειτουργία του αναπνευστικού και του κυκλοφοριακού συστήματος, του Κ.Ν.Σ και του (αυτόνομου), καθώς και στη σωματική κινητικότητα και τη συμπεριφορά. Η προσοχή πρέπει να εστιάζεται σε παρατηρήσεις των σημείων τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, υπνηλίας, λήθαργου και κώματος. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι γενικές αρχές και τα κριτήρια που συνοψίζονται στο καθοδηγητικό έγγραφο για τα τελικά σημεία ευθανασίας (9). Τα ετοιμοθάνατα ζώα και όσα παρουσιάζουν ισχυρούς πόνους ή διαρκή σημεία έντονης δυσφορίας θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία. Ο χρόνος θανάτου των ζώων που θανατώνονται για να μην υποφέρουν ή βρίσκονται νεκρά θα πρέπει να σημειώνεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

1.6.1 **Βάρος σώματος**

Το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετριέται λίγο πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και, κατόπιν, τουλάχιστον ανά εβδομάδα. Πρέπει να υπολογίζονται οι αλλαγές βάρους και να καταγράφονται. Στο τέλος της δοκιμής, τα ζώα που έχουν επιζήσει ζυγίζονται και έπειτα θανατώνονται με ευθανασία.

1.6.2 **Παθολογία**

Σε όλα τα ζώα της δοκιμής (συμπεριλαμβανομένων εκείνων που πεθαίνουν στη διάρκεια της δοκιμής ή αποσύρονται από τη μελέτη για να μην υποφέρουν) πρέπει να διενεργείται μη λεπτομερειακή νεκροψία-νεκροτομία. Για κάθε ζώο, πρέπει να καταγράφονται όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις. Στα ζώα που επιζούν 24 ή περισσότερες ώρες μετά τη χορήγηση της πρώτης δόσης, μπορεί επιπλέον να πραγματοποιείται μικροσκοπική εξέταση των οργάνων που εμφανίζουν μακροσκοπικώς παθολογικές αλλοιώσεις, καθώς από την εξέταση αυτή ενδέχεται να προκύψουν χρήσιμα στοιχεία.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Πρέπει να παρέχονται τα δεδομένα για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, το σύνολο των δεδομένων πρέπει να συνοψίζεται σε πίνακα, όπου θα εμφαίνονται, για κάθε ομάδα της δοκιμής, ο αριθμός ζώων που χρησιμοποιήθηκαν, ο αριθμός ζώων που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, ο αριθμός ζώων που βρέθηκαν νεκρά στη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην υποφέρουν, ο χρόνος θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και εξέλιξη των τοξικών επιδράσεων και κατά πόσον ήταν ανατάξιμες, καθώς και τα ευρήματα από τη νεκροψία.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1 **Έκθεση δοκιμής**

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, εφόσον έχει σημασία, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης)·

— στοιχεία ταυτότητας, μεταξύ των οποίων τον αριθμό CAS.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής άλλου φορέα εκτός από νερό.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε·

▼B

— μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή·

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων (όπου συμπεριλαμβάνεται, κατά περίπτωση, αιτιολόγηση της χρήσης αρσενικών αντί θηλυκών ζώων)·

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κλπ..

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες για τον τύπο της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της φυσικής κατάστασης στην οποία χορηγήθηκε·

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένων των όγκων και του χρόνου χορήγησης των δόσεων·

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού)·

— αιτιολόγηση της επιλογής της αρχικής δόσης.

Αποτελέσματα:

— πίνακα με τα δεδομένα απόκρισης και τα επίπεδα δόσης για κάθε ζώο (δηλ. ζώα που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των επιδράσεων)·

— πίνακα με τα βάρη των ζώων και τις μεταβολές τους·

— για κάθε ζώο, βάρος την ημέρα χορήγησης της δόσης, κατόπιν ανά εβδομάδα και, τέλος, κατά το χρόνο θανάτου ή θανάτωσης·

— ημερομηνία και ώρα θανάτου, εάν επήλθε νωρίτερα από την προγραμματισμένη θανάτωση·

— για κάθε ζώο, το χρόνο εκδήλωσης και την εξέλιξη των συμπτωμάτων τοξικότητας, καθώς και το κατά πόσον αυτά ήταν ανατάξιμα·

— για κάθε ζώο, ευρήματα από τη νεκροψία και και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα, εφόσον υπάρχουν.

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα.

4 **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129-134

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method — An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl .oecd.org/-oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

Παραρτημα 1

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΦΑΡΜΟΖΕΤΑΙ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΣΗ

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Η διαδικασία που πρέπει να εφαρμόζεται για κάθε αρχική δόση περιγράφεται σχηματικά στα αντίστοιχα διαγράμματα δοκιμών του παρόντος παραρτήματος.

— Παράρτημα 1 Α: αρχική δόση 5 mg/kg βάρους σώματος

— Παράρτημα 1 Β: αρχική δόση 50 mg/kg βάρους σώματος

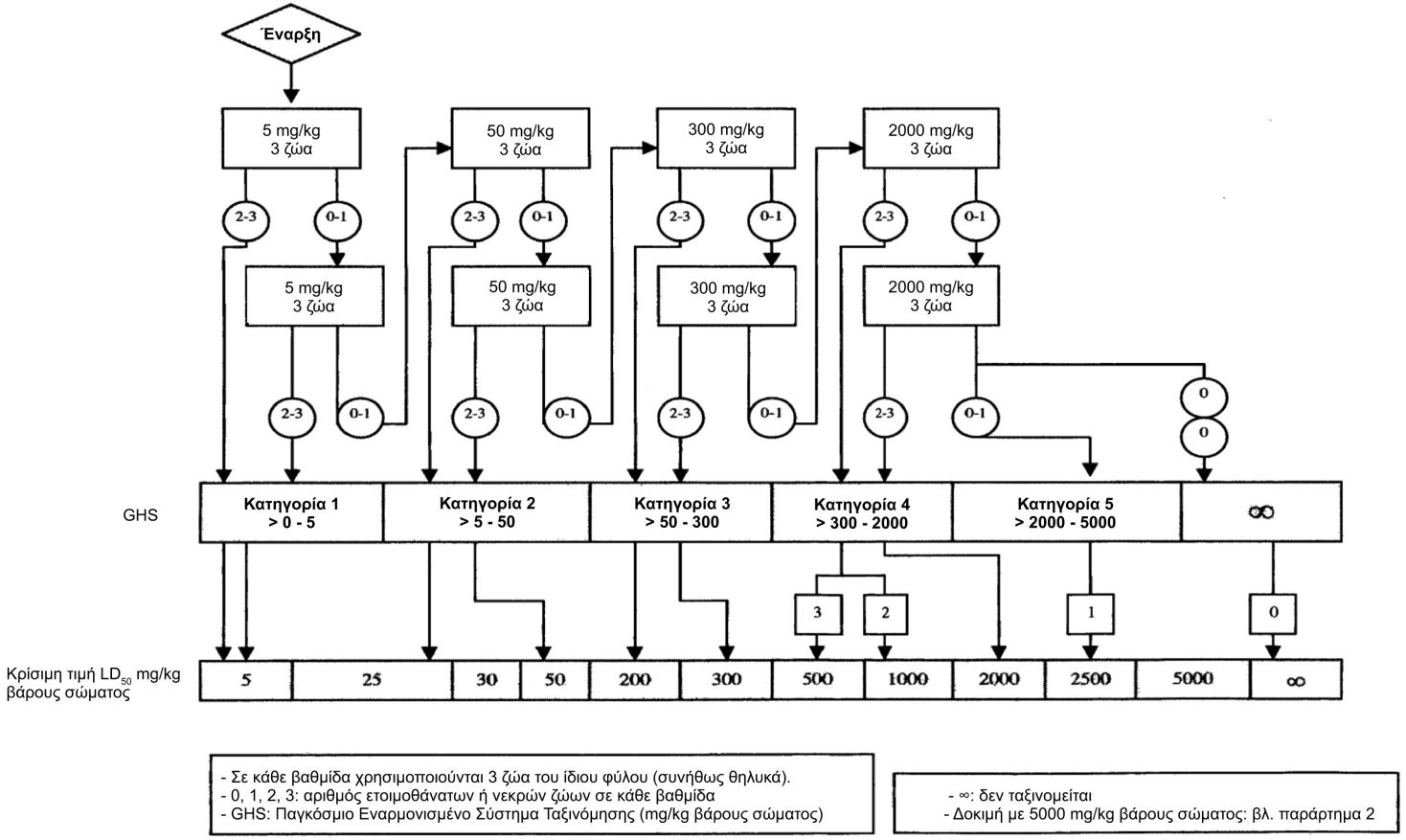
— Παράρτημα 1 Γ: αρχική δόση 300 mg/kg βάρους σώματος

— Παράρτημα 1 Δ: αρχική δόση 2 000 mg/kg βάρους σώματος.

Ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που θανατώνονται με ευθανασία ή βρίσκονται νεκρά, η διαδικασία δοκιμών ακολουθεί την πορεία που υποδεικνύεται με βέλη.

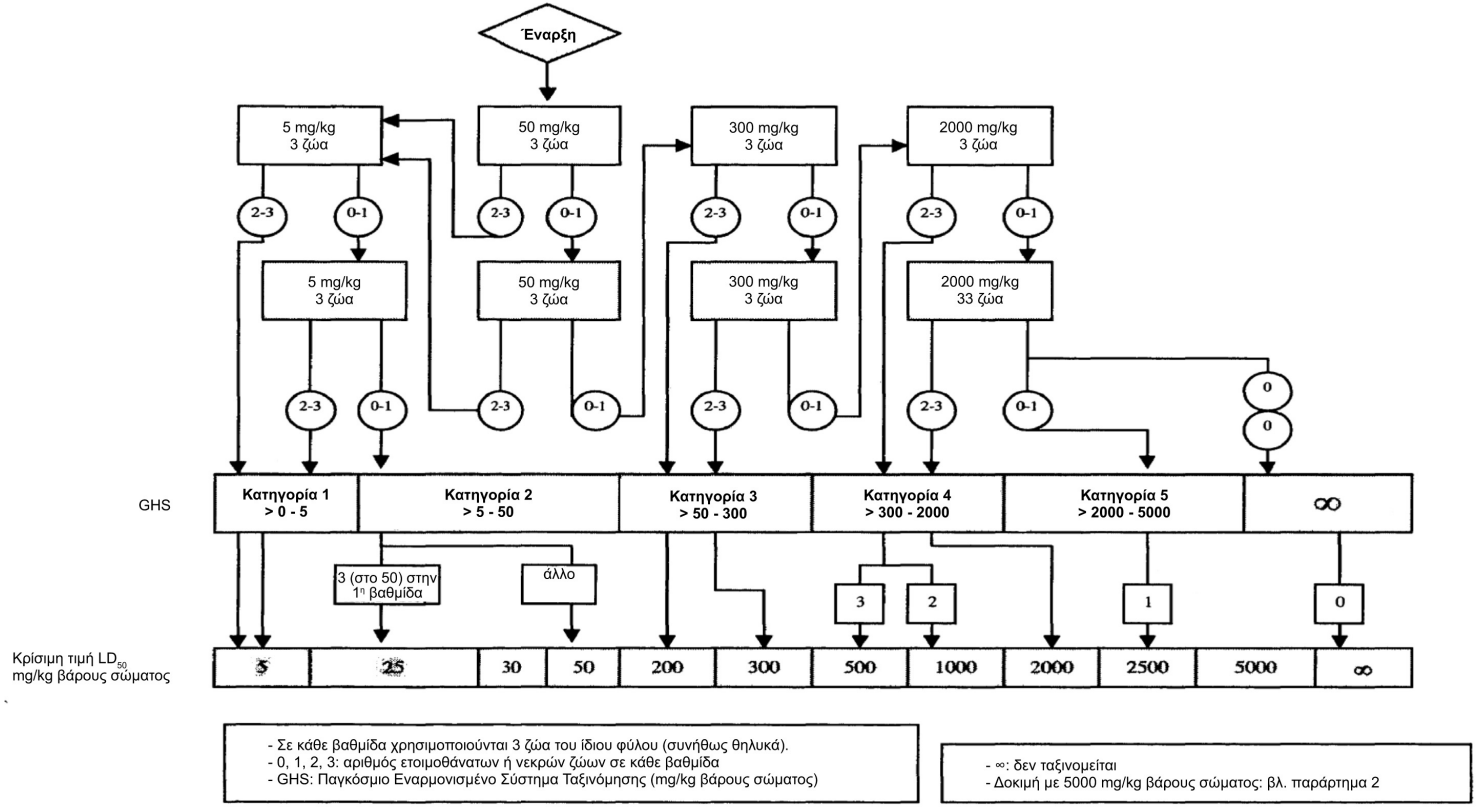
Παραρτημα 1 Α

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΣΗ 5 MG/KG ΒΑΡΟΥΣ ΣΩΜΑΤΟΣ



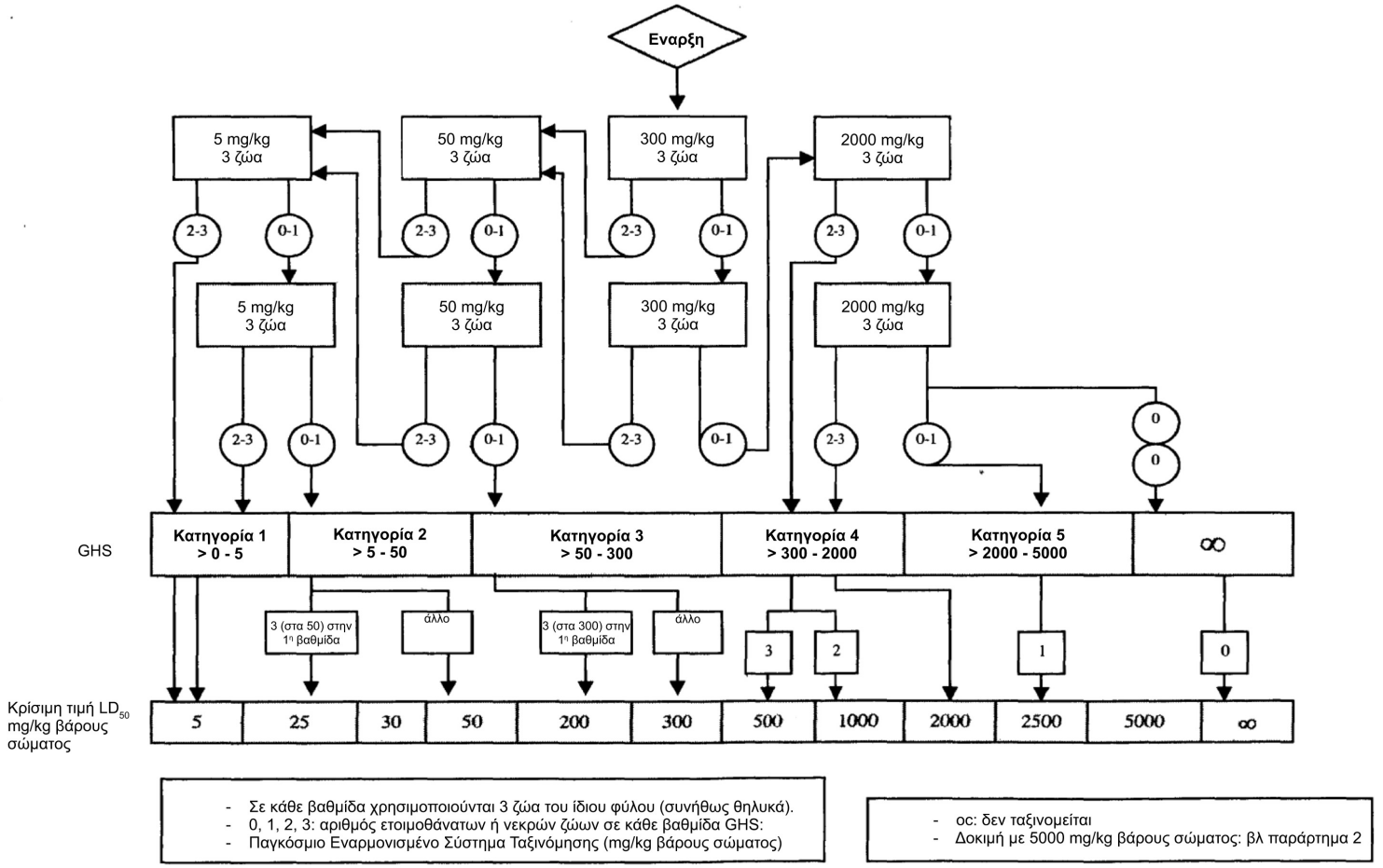
Παραρτημα 1 Β

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΣΗ 50 MG/KG ΒΑΡΟΥΣ ΣΩΜΑΤΟΣ



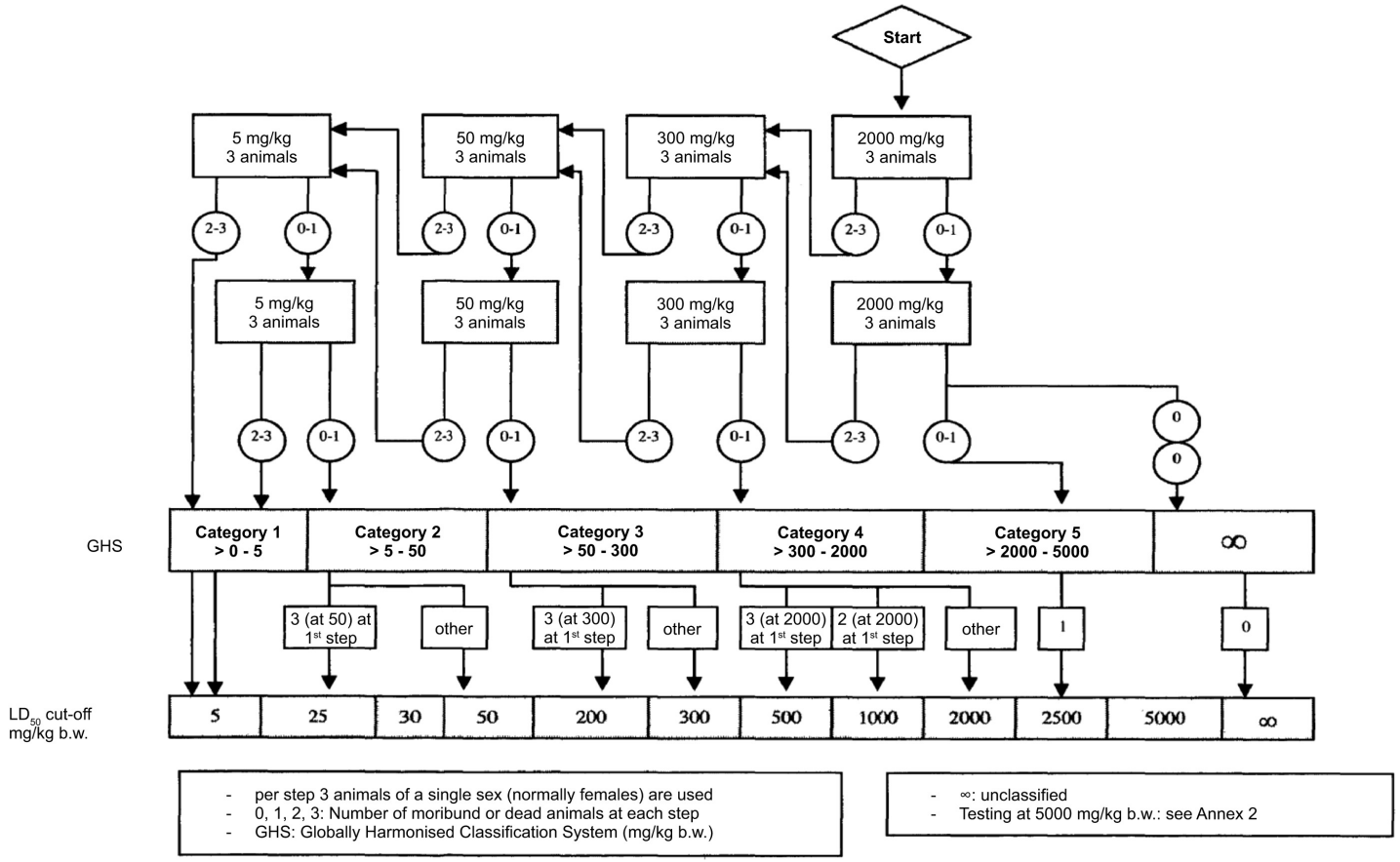
Παραρτημα 1 Γ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΣΗ 300 MG/KG ΒΑΡΟΥΣ ΣΩΜΑΤΟΣ



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 Δ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΣΗ 2 000 MG/KG ΒΑΡΟΥΣ ΣΩΜΑΤΟΣ



▼B

Παραρτημα 2

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΩΝ ΟΠΟΙΩΝ ΟΙ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ LD_{50} ΥΠΕΡΒΑΙΝΟΥΝ ΤΑ 2 000 MG/KG, ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΝΑ ΔΙΕΞΑΧΘΟΥΝ ΔΟΚΙΜΕΣ

Σκοπός των κριτηρίων ταξινόμησης στην κατηγορία κινδύνου 5 είναι να επιτρέψουν την ταυτοποίηση ελεγχόμενων ουσιών που ενέχουν σχετικά χαμηλό κίνδυνο οξείας τοξικότητας, αλλά σε ορισμένες περιστάσεις ενδέχεται να είναι επικίνδυνες για ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού. Η τιμή LD_{50} από το στόμα ή το δέρμα για τις ουσίες αυτές αναμένεται να περιλαμβάνεται στη περιοχή τιμών 2 000-5 000 mg/kg ή ισοδύναμων δόσεων, προκειμένου για άλλες οδούς έκθεσης. Μια ελεγχόμενη ουσία θα μπορούσε να ταξινομηθεί στην κατηγορία κινδύνου που ορίζεται από την κλίμακα: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (κατηγορία 5 κατά GHS) στις ακόλουθες περιπτώσεις:

α) εάν κάποιο από τα σχήματα δοκιμών του παραρτήματος 1 Α-Δ κατευθύνει προς την κατηγορία αυτή με βάση τη συχνότητα θανάτων·

β) εάν υπάρχουν ήδη αξιόπιστα στοιχεία που δείχνουν ότι η τιμή LD_{50} περιλαμβάνεται στη περιοχή τιμών της κατηγορίας 5 ή εάν τα αποτελέσματα άλλων μελετών σε ζώα ή παρατηρήσεις τοξικών επιδράσεων στον άνθρωπο δημιουργούν ανησυχίες για οξείες βλάβες στην υγεία του ανθρώπου·

γ) εάν μετά από παρέκταση δεδομένων, υπολογισμούς κατά προσέγγιση ή μετρήσεις δεν δικαιολογείται η κατάταξη σε ανώτερη κατηγορία κινδύνου και

— υπάρχουν αξιόπιστα στοιχεία που δείχνουν σοβαρές τοξικές επιδράσεις στον άνθρωπο ή

— έχει παρατηρηθεί θνησιμότητα σε δοκιμές από το στόμα με τιμές δόσεων έως και της κατηγορίας 4 ή

— οι απόψεις των ειδικών επιβεβαιώνουν σοβαρά κλινικά συμπτώματα τοξικότητας —εκτός από διάρροια, ανόρθωση του τριχώματος και ταλαιπωρημένη εμφάνιση— που έχουν παρατηρηθεί σε δοκιμές με τιμές δόσεων έως και της κατηγορίας 4 ή

— οι απόψεις των ειδικών επιβεβαιώνουν αξιόπιστες ενδείξεις πιθανής σοβαρής, οξείας τοξικής επίδρασης, οι οποίες έχουν προκύψει από άλλες μελέτες σε ζώα.

ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΔΟΣΕΙΣ ΑΝΩ ΤΩΝ 2 000 mg/kg

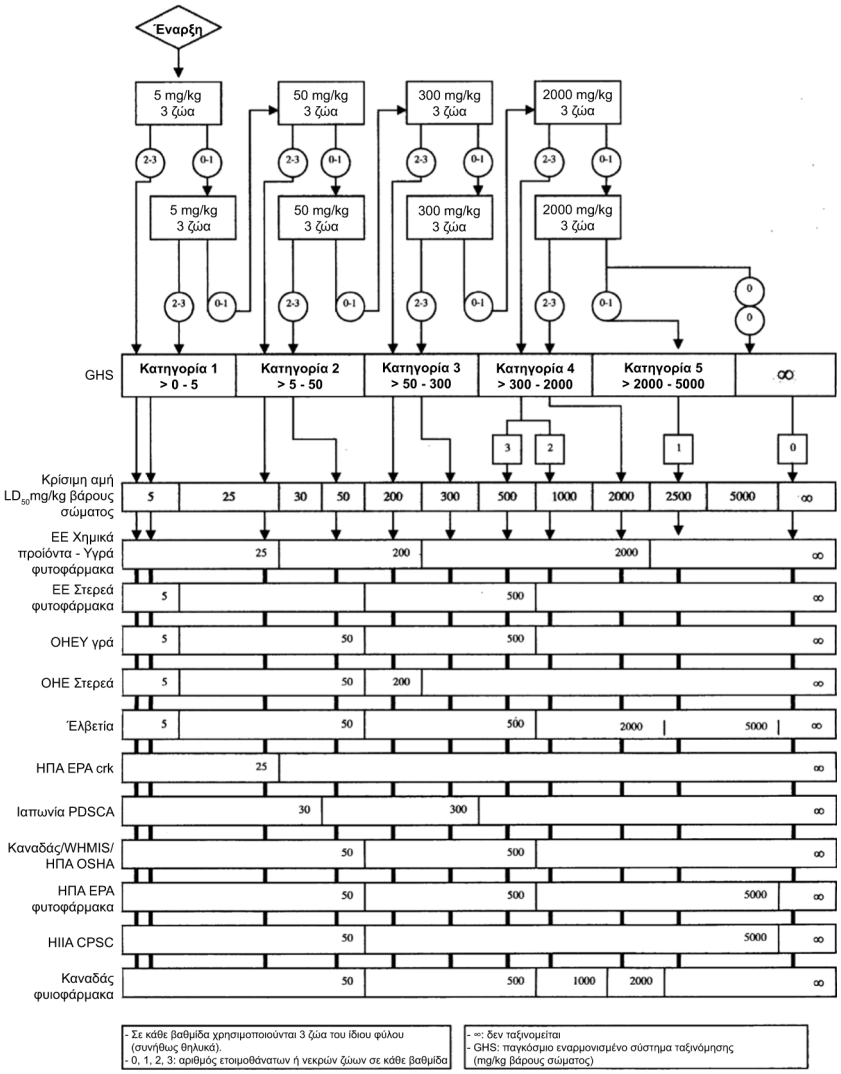
Για λόγους προστασίας των ζώων, η διεξαγωγή δοκιμών με δόσεις του εύρους τιμών που ορίζει την κατηγορία 5 (2 000-5 000 mg/kg) δεν συνιστάται και θα πρέπει να εξετάζεται μόνον εφόσον υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών να έχουν άμεση, σημασία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου ή των ζώων (10). Δεν θα πρέπει να διεξάγονται άλλες δοκιμές με υψηλότερες δόσεις.

Εφόσον απαιτείται δοκιμή με δόση 5 000 mg/kg, αυτή διεξάγεται σε μία μόνο βαθμίδα (δηλαδή, σε τρία ζώα). Εάν το πρώτο ζώο πεθάνει, το επόμενο βήμα είναι η χορήγηση 2 000 mg/kg σύμφωνα με τα διαγράμματα ροής του παραρτήματος 1. Εάν το πρώτο ζώο' επιζήσει, η δόση χορηγείται σε δύο ακόμη ζώα. Εάν πεθάνει μόνον ένα από τα δύο ζώα, τότε η τιμή LD_{50} αναμένεται να υπερβαίνει τα 5 000 mg/kg. Εάν πεθάνουν και τα δύο, το επόμενο βήμα είναι η χορήγηση 2 000 mg/kg.

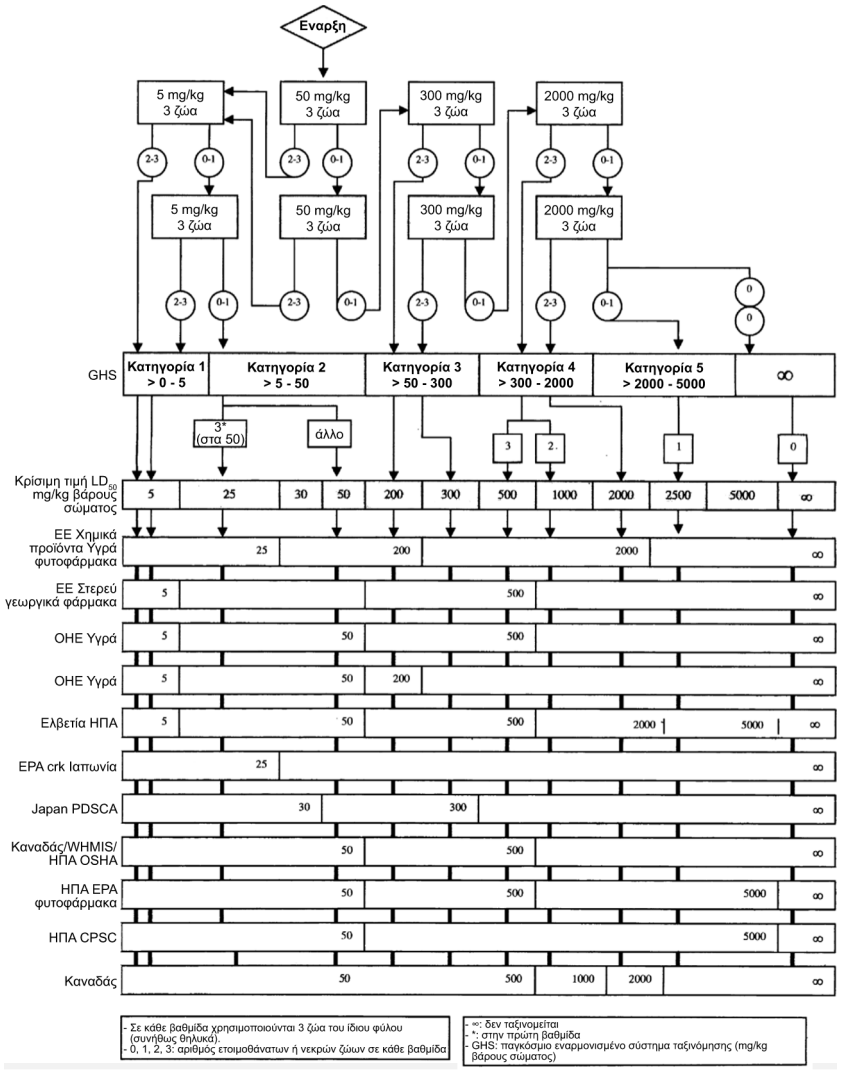
▼B

Παραρτημα 3

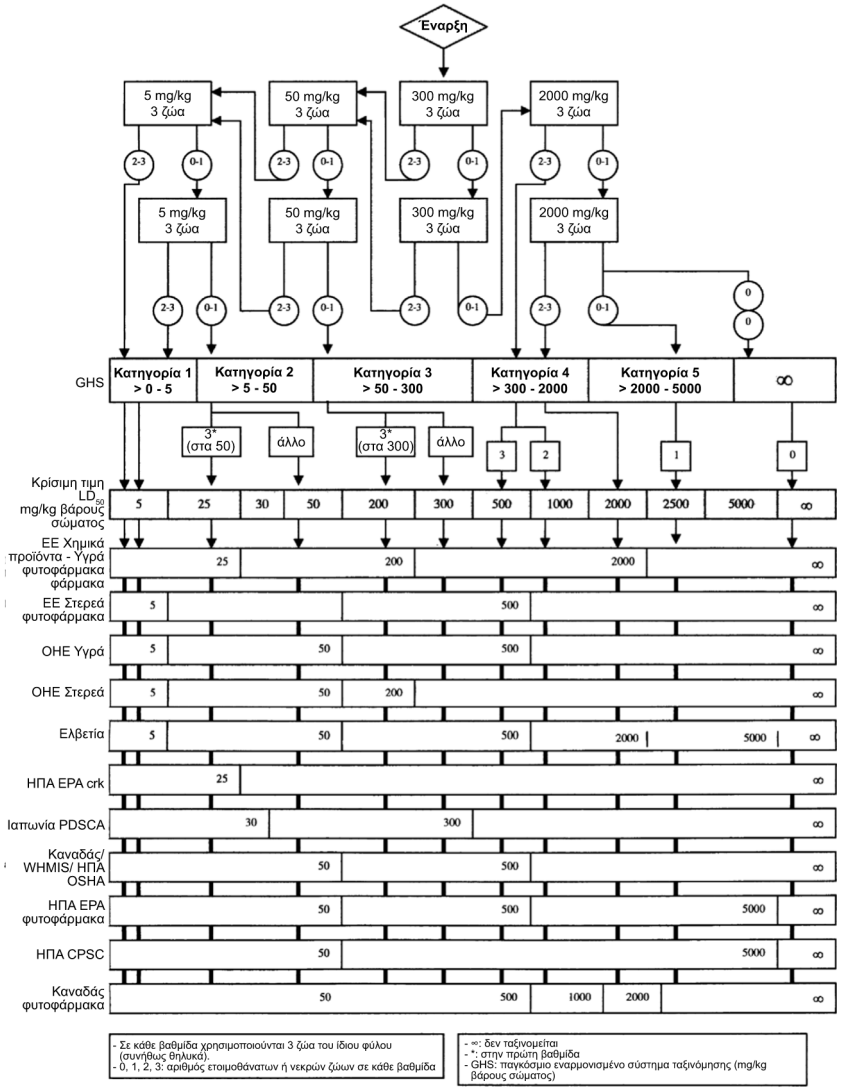
ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ Β.1.β: Οδηγίες για την ταξινόμηση σύμφωνα με το σύστημα της ΕΕ κατά τη μεταβατική περίοδο μέχρι να εφαρμοστεί πλήρως το Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης (GHS) [έχουν ληφθεί από τη δημοσίευση (8)]



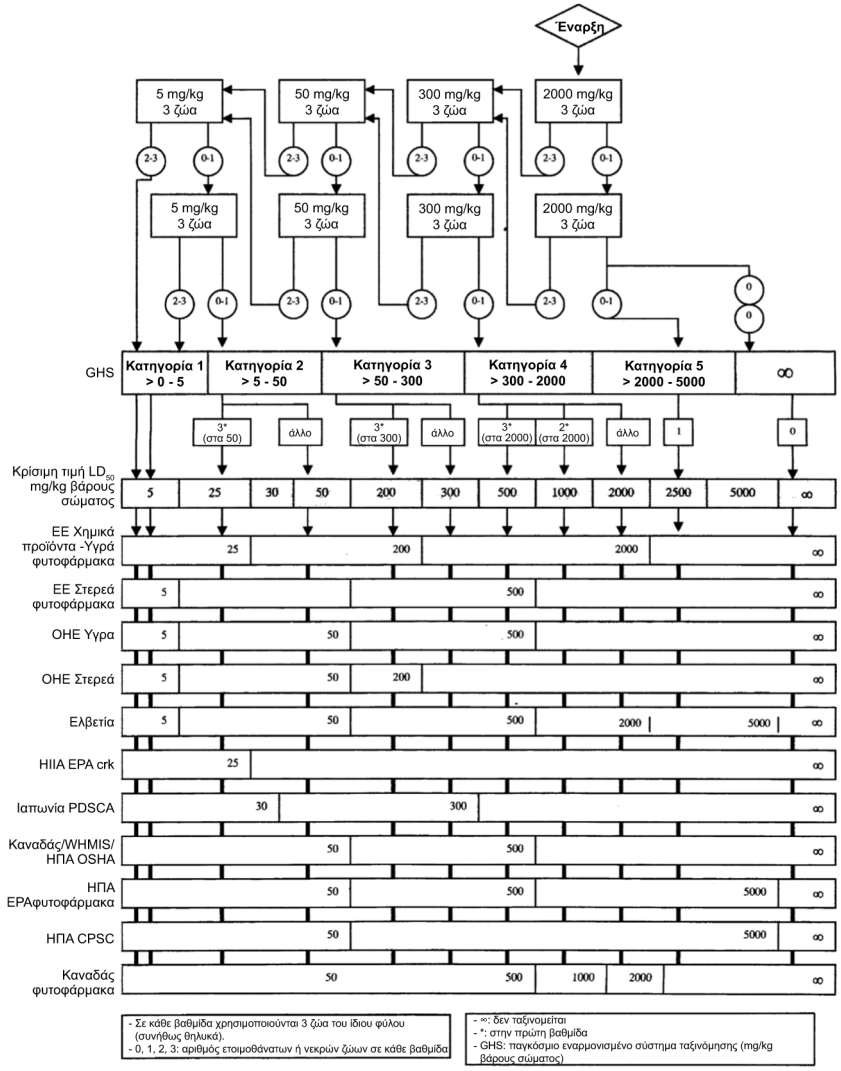
▼B


Έναρξη
5 mg/kg 3 ζώα
50 mg/kg 3 ζώα
300 mg/kg 3 ζώα
2000 mg/kg 3 ζώα
2-3
0-1
0
GHS
Κατηγορία 1 > 0 - 5
Κατηγορία 2 > 5 - 50
Κατηγορία 3 > 50 - 300
Κατηγορία 4 > 300 - 2000
Κατηγορία 5 > 2000 - 5000
∞
3* (στα 50)
άλλο
Κρίσιμη τιμή LD50 mg/kg βάρους σώματος
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ΕΕ Χημικά προϊόντα Υγρά φυτοφάρμακα
ΕΕ Στερεύ γεωργικά φάρμακα
ΟΗΕ Υγρά
ΟΗΕ Υγρά
Ελβετία ΗΠΑ
EPA crk Ιαπωνία
Japan PDSCA
Καναδάς/WHMIS/ ΗΠΑ OSHA
ΗΠΑ EPA φυτοφάρμακα
ΗΠΑ CPSC
Καναδάς
- Σε κάθε βαθμίδα χρησιμοποιούνται 3 ζώα του ίδιου φύλου (συνήθως θηλυκά).
- 0, 1, 2, 3: αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων σε κάθε βαθμίδα
- ∞: δεν ταξινομείται
- *: στην πρώτη βαθμίδα
- GHS: παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης (mg/kg βάρους σώματος)

▼B


Έναρξη
5 mg/kg 3 ζώα
50 mg/kg 3 ζώα
300 mg/kg 3 ζώα
2000 mg/kg 3 ζώα
2-3
0-1
0
GHS
Κατηγορία 1 > 0 - 5
Κατηγορία 2 > 5 - 50
Κατηγορία 3 > 50 - 300
Κατηγορία 4 > 300 - 2000
Κατηγορία 5 > 2000 - 5000
∞
3* (στα 50)
άλλο
3* (στα 300)
άλλο
3
2
1
0
Κρίσιμη τιμη LD50 mg/kg βάρους σώματος
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ΕΕ Χημικά προϊόντα - Υγρά φυτοφάρμακα φάρμακα
25 200 2000 ∞
ΕΕ Στερεά φυτοφάρμακα
5 500 ∞
ΟΗΕ Υγρά
5 50 500 ∞
ΟΗΕ Στερεά
5 50 200 ∞
Ελβετία
5 50 500 2000 5000 ∞
ΗΠΑ EPA crk
25 ∞
Ιαπωνία PDSCA
30 300 ∞
Καναδάς/ WHMIS/ ΗΠΑ OSHA
50 500 ∞
ΗΠΑ EPA φυτοφάρμακα
50 500 5000 ∞
ΗΠΑ CPSC
50 5000 ∞
Καναδάς φυτοφάρμακα
50 500 1000 2000 ∞
- Σε κάθε βαθμίδα χρησιμοποιούνται 3 ζώα του ίδιου φύλου (συνήθως θηλυκά).
- 0, 1, 2, 3: αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων σε κάθε βαθμίδα
- ∞: δεν ταξινομείται
- *: στην πρώτη βαθμίδα
- GHS: παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης (mg/kg βάρους σώματος)

▼B


Έναρξη
5 mg/kg 3 ζώα
50 mg/kg 3 ζώα
300 mg/kg 3 ζώα
2000 mg/kg 3 ζώα
2-3
0-1
0
GHS
Κατηγορία 1 > 0 - 5
Κατηγορία 2 > 5 - 50
Κατηγορία 3 > 50 - 300
Κατηγορία 4 > 300 - 2000
Κατηγορία 5 > 2000 - 5000
∞
3* (στα 50)
άλλο
3* (στα 300)
3* (στα 2000)
2* (στα 2000)
1
Κρίσιμη τιμή LD50 mg/kg βάρους σώματος
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ΕΕ Χημικά προϊόντα -Υγρά φυτοφάρμακα
ΕΕ Στερεά φυτοφάρμακα
ΟΗΕ Υγρα
ΟΗΕ Στερεά
Ελβετία
HIIA EPA crk
Ιαπωνία PDSCA
Καναδάς/WHMIS/ ΗΠΑ OSHA
ΗΠΑ EPAφυτοφάρμακα
ΗΠΑ CPSC
Καναδάς φυτοφάρμακα
- Σε κάθε βαθμίδα χρησιμοποιούνται 3 ζώα του ίδιου φύλου (συνήθως θηλυκά).
- 0, 1, 2, 3: αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων σε κάθε βαθμίδα
- ∞: δεν ταξινομείται
- *: στην πρώτη βαθμίδα
- GHS: παγκόσμιο εναρμονισμένο σύστημα ταξινόμησης (mg/kg βάρους σώματος)

▼M4

Β.2. ΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 403 του ΟΟΣΑ (2009) (1). Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 403 (TG 403) για την οξεία αναπνευστική τοξικότητα εκδόθηκε το 1981. Η παρούσα αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών Β.2 (όντας ισοδύναμη της αναθεωρημένης TG 403) έχει σχεδιαστεί ώστε να είναι πιο ευέλικτη, να περιορίζει τη χρήση ζώων και να καλύπτει κανονιστικές ανάγκες. Η αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει δύο τύπους μελετών: ένα παραδοσιακό πρωτόκολλο LC_{50} και ένα πρωτόκολλο «συγκέντρωση × χρόνος» (C × t). Κύρια χαρακτηριστικά της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η ικανότητά της να παρέχει σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης που κυμαίνεται από θανατηφόρα έως μη θανατηφόρα αποτελέσματα, ώστε να προσδιορίζονται η διάμεσος θανατηφόρας συγκέντρωσης (LC_{50}), η μη θανατηφόρα οριακή συγκέντρωση (π.χ. LC_{01}) και η κλίση, καθώς και να εντοπίζει την πιθανή ευαισθησία ανάλογα με το φύλο. Το πρωτόκολλο C × t θα πρέπει να χρησιμοποιείται όταν υπάρχει συγκεκριμένη κανονιστική ή επιστημονική ανάγκη που υπαγορεύει τη διεξαγωγή δοκιμών σε ζώα για πολλαπλά χρονικά διαστήματα, όπως για τον σχεδιασμό αντίδρασης σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης [π.χ. συναγωγή κατευθυντήριων επιπέδων οξείας έκθεσης (AEGL), κατευθυντήριων γραμμών σχεδιασμού αντίδρασης σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης (ERPG) ή οριακών επιπέδων οξείας έκθεσης (AETL)] ή για χωροταξικό σχεδιασμό.

2. Καθοδήγηση σχετικά με την εκπόνηση και την ερμηνεία των μελετών με την παρούσα μέθοδο δοκιμών παρέχει το έγγραφο καθοδήγησης για τη διεξαγωγή δοκιμών οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (GD 39) (2).

3. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρατίθενται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο GD 39 (2).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών επιτρέπει τον χαρακτηρισμό ελεγχόμενων χημικών ουσιών και την ποσοτική εκτίμηση των κινδύνων, καθώς και την κατάταξη και ταξινόμηση των ελεγχόμενων χημικών ουσιών σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (3). Το έγγραφο GD 39 (2) παρέχει καθοδήγηση σχετικά με την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου δοκιμών για τη διεξαγωγή δοκιμών οξείας τοξικότητας. Όταν απαιτούνται μόνο πληροφορίες για την ταξινόμηση και την επισήμανση, συνιστάται γενικά το κεφάλαιο Β.52 του παρόντος παραρτήματος (4) [βλέπε GD 39 (2)]. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.2 δεν προορίζεται ειδικά για τον έλεγχο εξειδικευμένων υλικών, όπως δυσδιάλυτων ισομετρικών ή ινωδών υλικών ή βιομηχανικών νανοϋλικών.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

5. Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, το εργαστήριο θα πρέπει να εξετάζει όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία, συμπεριλαμβανομένων υφιστάμενων μελετών [π.χ. κεφάλαιο Β.52 του παρόντος παραρτήματος (4)], τα δεδομένα των οποίων θα υποστήριζαν τη μη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών, ώστε να ελαχιστοποιείται η χρήση ζώων. Πληροφορίες που μπορούν να βοηθήσουν στην επιλογή των καταλληλότερων ειδών, φυλών, φύλων, τρόπων έκθεσης και των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας in vitro ή in vivo, οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου, τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR και τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς ουσίες [βλέπε GD 39 (2)].

▼M4

6. Η διεξαγωγή δοκιμών με διαβρωτικές και/ή ερεθιστικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε συγκεντρώσεις που αναμένεται να προκαλέσουν σοβαρό πόνο και/ή δυσφορία θα πρέπει να αποφεύγεται στο μέτρο του δυνατού. Η διαβρωτική/ερεθιστική δράση θα πρέπει να αξιολογείται κατά την κρίση των ειδικών, με τη χρήση αποδεικτικών στοιχείων όπως η προηγούμενη εμπειρία σε σχέση με ανθρώπους και ζώα (π.χ. από μελέτες επαναλαμβανόμενης δόσης με μη διαβρωτικές/ερεθιστικές συγκεντρώσεις), υφιστάμενα δεδομένα in vitro [π.χ. από τα κεφάλαια Β.40 (5) και Β.40α (6) του παρόντος παραρτήματος ή από την TG 435 (7) του ΟΟΣΑ], τιμές pH, πληροφορίες για παρόμοιες ουσίες ή οποιαδήποτε άλλα συναφή δεδομένα, ώστε να διερευνάται αν είναι δυνατόν να μη διεξαχθούν περαιτέρω δοκιμές. Για συγκεκριμένες κανονιστικές ανάγκες (π.χ. κατάρτιση σχεδίων έκτακτης ανάγκης), η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έκθεση ζώων, καθώς επιτρέπει στον διευθυντή της μελέτης ή στον κύριο ερευνητή να ελέγχει την επιλογή των συγκεντρώσεων στόχου. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις στόχου, χωρίς να έχουν ισχυρή διαβρωτική και ερεθιστική δράση, θα πρέπει να επαρκούν για την επέκταση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης σε επίπεδα που επιτυγχάνουν τους κανονιστικούς και επιστημονικούς στόχους της δοκιμής. Οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να επιλέγονται κατά περίπτωση και η επιλογή τους θα πρέπει να αιτιολογείται [βλέπε GD 39 (2)].

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η παρούσα αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών Β.2 έχει σχεδιαστεί με σκοπό να λαμβάνονται επαρκείς πληροφορίες για την οξεία τοξικότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, ώστε να είναι δυνατή η ταξινόμησή της και να προκύπτουν, για ένα ή και για τα δύο φύλα, τα δεδομένα θνησιμότητας (π.χ. LC_{50}, LC_{01} και κλίση) που απαιτούνται για ποσοτικές εκτιμήσεις κινδύνου. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει δύο μεθόδους. Η πρώτη είναι ένα παραδοσιακό πρωτόκολλο στο οποίο ομάδες ζώων εκτίθενται σε μια οριακή συγκέντρωση (οριακή δοκιμή) ή σε σειρά συγκεντρώσεων, με μια κλιμακωτή διαδικασία, για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, συνήθως 4 ωρών. Επιτρέπεται να εφαρμόζονται άλλοι χρόνοι έκθεσης για την εξυπηρέτηση ειδικών κανονιστικών σκοπών. Η δεύτερη μέθοδος είναι ένα πρωτόκολλο C × t, στο οποίο ομάδες ζώων εκτίθενται σε μια συγκέντρωση (οριακή συγκέντρωση) ή σε σειρά πολλαπλών συγκεντρώσεων για διάφορα χρονικά διαστήματα.

8. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν σαφή σημεία πόνου ή έντονης και διαρκούς δυσφορίας, θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία και λαμβάνονται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων με τον ίδιο τρόπο όπως τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη δοκιμή. Τα κριτήρια για τη λήψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και κατευθύνσεις για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικείμενου θανάτου, αποτελούν το αντικείμενο του εγγράφου καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (8).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

9. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Το προτιμώμενο είδος είναι ο επίμυς και, εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη, πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση.

Προετοιμασία των ζώων

10. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Κατά την ημέρα της έκθεσης, τα ζώα θα πρέπει να είναι νεαρά ενήλικα, ηλικίας 8 έως 12 εβδομάδων, ενώ η διακύμανση των βαρών των ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους, για κάθε φύλο, των ζώων της ίδιας ηλικίας που έχουν ενδεχομένως εκτεθεί στο παρελθόν. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία και σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός. Παραμένουν στους κλωβούς τους επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου. Τα ζώα πρέπει επίσης να εγκλιματίζονται στην πειραματική συσκευή για σύντομο χρονικό διάστημα πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, καθώς αυτό θα μειώσει το άγχος που προκαλείται από την εισαγωγή στο νέο περιβάλλον.

▼M4

Ζωοτεχνία

11. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται, σε ιδανικές συνθήκες, εντός ενός εύρους 30 έως 70 %, αν και αυτό ενδέχεται να μην είναι δυνατόν όταν χρησιμοποιείται το νερό ως φορέας. Πριν και μετά την έκθεση, τα ζώα πρέπει γενικά να στεγάζονται σε κλωβούς σε ομάδες ανά φύλο και συγκέντρωση, αλλά ο αριθμός των ζώων ανά κλωβό πρέπει να μην εμποδίζει την παρατήρηση κάθε ζώου και να ελαχιστοποιεί τυχόν απώλειες λόγω κανιβαλισμού ή μαχών. Όταν τα ζώα πρόκειται να εκτεθούν μόνο ρινικά, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να εγκλιματιστούν στους σωλήνες συγκράτησης. Οι σωλήνες συγκράτησης δεν θα πρέπει να προκαλούν στα ζώα περιττή σωματική ή θερμική δυσφορία ή δυσφορία λόγω ακινητοποίησης. Η συγκράτηση ενδέχεται να επηρεάζει τα φυσικά καταληκτικά σημεία, όπως τη θερμοκρασία του σώματος (υπερθερμία) και/ή τον όγκο του αναπνεόμενου αέρα ανά λεπτό. Εάν υπάρχουν γενικά δεδομένα που δείχνουν ότι δεν προκαλούνται τέτοιες αλλαγές σε σημαντικό βαθμό, δεν είναι απαραίτητη η προκαταρκτική προσαρμογή στους σωλήνες συγκράτησης. Τα ζώα που εκτίθενται ολόσωμα σε αερόλυμα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά κατά τη διάρκεια της έκθεσης, ώστε να αποφεύγεται η διήθηση του ελεγχόμενου αερολύματος μέσω του τριχώματος των ζώων που στεγάζονται στον ίδιο κλωβό. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά και πιστοποιημένα εργαστηριακά σιτηρέσια, εκτός από το διάστημα της έκθεσης, συνοδευόμενα από απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού από το δίκτυο ύδρευσης. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών.

Θάλαμοι εισπνοής

12. Κατά την επιλογή θαλάμου εισπνοής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η φύση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και ο στόχος της δοκιμής. Προτιμώμενος τρόπος έκθεσης είναι η ρινική έκθεση (ο όρος περιλαμβάνει την κεφαλική, τη ρινική και τη ρυγχική έκθεση). Η ρινική έκθεση προτιμάται γενικά για μελέτες με υγρά ή στερεά αερολύματα και για ατμούς που μπορεί να συμπυκνωθούν σχηματίζοντας αερολύματα. Ειδικοί στόχοι της μελέτης ενδέχεται να επιτυγχάνονται καλύτερα με ολόσωμη έκθεση, αλλά αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται στην έκθεση της μελέτης. Για να εξασφαλίζεται η σταθερότητα της ατμόσφαιρας κατά τη χρήση θαλάμου ολόσωμης έκθεσης, ο συνολικός όγκος των πειραματόζωων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του θαλάμου. Οι αρχές των τεχνικών ρινικής και ολόσωμης έκθεσης, καθώς και τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους, περιγράφονται στο έγγραφο GD 39 (2).

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χορήγηση των συγκεντρώσεων

13. Οι ρινικές εκθέσεις επιμύων μπορούν να έχουν οποιαδήποτε διάρκεια, με ανώτατο όριο τις 6 ώρες. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης ποντικών, η διάρκειά της δεν θα πρέπει γενικά να υπερβαίνει τις 4 ώρες. Εάν απαιτούνται μελέτες μεγαλύτερης διάρκειας, πρέπει να παρέχεται αιτιολόγηση [βλέπε GD 39 (2)]. Τα ζώα που εκτίθενται σε αερολύματα σε θαλάμους ολόσωμης έκθεσης θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά, ώστε να αποφεύγεται η κατάποση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατά την περιποίηση από τα άλλα ζώα που στεγάζονται στον ίδιο κλωβό. Κατά την περίοδο έκθεσης τα ζώα θα πρέπει να στερούνται τροφής. Νερό μπορεί να παρέχεται καθ' όλη τη διάρκεια της ολόσωμης έκθεσης.

14. Τα ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία σε μορφή αερίου, ατμών, αερολύματος ή μείγματος αυτών. Η φυσική κατάσταση που ελέγχεται εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, την επιλεχθείσα συγκέντρωση και/ή τη φυσική μορφή που είναι η πιθανότερη κατά τον χειρισμό και τη χρήση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Υγροσκοπικές και χημικά δραστικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή υπό συνθήκες ξηρού αέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην παράγονται εκρηκτικές συγκεντρώσεις.

▼M4

Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

15. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων για όλα τα αερολύματα, καθώς και για ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνωθούν σχηματίζοντας αερολύματα. Για να είναι δυνατή η έκθεση όλων των σχετικών περιοχών της αναπνευστικής οδού, συνιστώνται αερολύματα με διάμεσο αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) 1 έως 4 μm, με γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g) 1,5 έως 3,0 (2) (9) (10). Παρόλο που θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για τη συμμόρφωση με το πρότυπο αυτό, εάν αυτό δεν είναι δυνατό θα πρέπει να αναφέρεται η γνώμη των ειδικών. Παραδείγματος χάριν, καπνοί μετάλλων ενδέχεται να υπολείπονται του προτύπου αυτού, ενώ φορτισμένα σωματίδια, ίνες και υγροσκοπικά υλικά (των οποίων το μέγεθος αυξάνεται στο υγρό περιβάλλον της αναπνευστικής οδού) ενδέχεται να το υπερβαίνουν.

Παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε φορέα

16. Επιτρέπεται να χρησιμοποιείται φορέας για την επίτευξη κατάλληλης συγκέντρωσης και κατάλληλου μεγέθους σωματιδίων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην ατμόσφαιρα. Κατά κανόνα, θα πρέπει να προτιμάται το νερό. Τα σωματιδιακά υλικά μπορούν να υποβάλλονται σε μηχανικές διεργασίες ώστε να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη κατανομή μεγέθους σωματιδίων, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην αποσυντίθεται ούτε να αλλοιώνεται η ελεγχόμενη χημική ουσία. Στις περιπτώσεις που θεωρείται ότι μηχανικές διεργασίες έχουν αλλοιώσει τη χημική σύσταση της ουσίας (π.χ. ακραίες θερμοκρασίες από υπερβολική άλεση λόγω τριβής), η σύσταση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει να εξακριβώνεται με ανάλυση. Θα πρέπει να λαμβάνεται κατάλληλη μέριμνα, ώστε να μην μολύνεται η ελεγχόμενη χημική ουσία. Δεν είναι απαραίτητο να υποβάλλονται σε δοκιμή μη εύθρυπτα κοκκώδη υλικά που έχουν σκοπίμως μορφοποιηθεί κατά τρόπο ώστε να μην είναι εισπνεύσιμα. Θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμή αντοχής στη φθορά λόγω τριβής ώστε να αποδεικνύεται ότι δεν παράγονται εισπνεύσιμα σωματίδια κατά τον χειρισμό κοκκώδους υλικού. Εάν παράγονται εισπνεύσιμες ουσίες κατά τη δοκιμή αντοχής στη φθορά λόγω τριβής, θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή αναπνευστικής τοξικότητας.

Ζώα-μάρτυρες

17. Δεν είναι απαραίτητη μια παράλληλη ομάδα ως αρνητικός (αέρας) μάρτυρας. Όταν χρησιμοποιείται άλλος φορέας εκτός από το νερό για τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ομάδα-μάρτυρας για τον εν λόγω φορέα μόνο όταν δεν υπάρχουν ιστορικά δεδομένα αναπνευστικής τοξικότητας. Εάν η μελέτη τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που έχει μορφοποιηθεί σε φορέα δεν αποκαλύψει τοξικότητα, συνάγεται ότι ο φορέας δεν είναι τοξικός στην ελεγχόμενη συγκέντρωση. Συνεπώς δεν χρειάζεται μάρτυρας για τον φορέα.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΘΕΣΗΣ

Ροή αέρα στον θάλαμο

18. Η ροή του αέρα μέσω του θαλάμου πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται τουλάχιστον σε ωριαία βάση κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης. Η παρακολούθηση της συγκέντρωσης στην πειραματική ατμόσφαιρα (ή της σταθερότητας) αποτελεί ολοκληρωτική μέτρηση όλων των δυναμικών παραμέτρων και έμμεσο τρόπο ελέγχου όλων των σχετικών δυναμικών παραμέτρων δημιουργίας της ατμόσφαιρας. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η εκ νέου αναπνοή στους θαλάμους ρινικής έκθεσης, στις περιπτώσεις που η ροή του αέρα μέσω του συστήματος έκθεσης είναι ανεπαρκής για την εξασφάλιση δυναμικής ροής της ατμόσφαιρας με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Έχουν καθοριστεί μεθοδολογίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποδειχθεί η απουσία εκ νέου αναπνοής υπό τις επιλεγμένες συνθήκες λειτουργίας (2) (11). Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 19 % και η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα να μην υπερβαίνει το 1 %. Εάν υπάρχει λόγος να θεωρείται ότι δεν μπορούν να τηρηθούν τα πρότυπα αυτά, πρέπει να μετρώνται οι συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα.

▼M4

Θερμοκρασία και σχετική υγρασία του θαλάμου

19. Η θερμοκρασία του θαλάμου πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία στη ζώνη αναπνοής των ζώων, τόσο για ρινική όσο και για ολόσωμη έκθεση, θα πρέπει να παρακολουθείται και να καταγράφεται τουλάχιστον τρεις φορές, σε περίπτωση έκθεσης διάρκειας έως 4 ωρών, και ανά ώρα, σε περίπτωση έκθεσης μικρότερης διάρκειας. Η σχετική υγρασία θα πρέπει, σε ιδανικές συνθήκες, να διατηρείται σε επίπεδα 30 έως 70 %, αλλά αυτό μπορεί να είναι είτε ανέφικτο (π.χ. κατά τη δοκιμή μειγμάτων που έχουν ως βάση το νερό) ή μη μετρήσιμο λόγω αλληλεπίδρασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με τη μέθοδο δοκιμών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: ονομαστική συγκέντρωση

20. Εάν είναι εφικτό, θα πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται η ονομαστική συγκέντρωση στον θάλαμο έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση ορίζεται ως η μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του συστήματος έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση δεν χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης των ζώων, αλλά η σύγκρισή της με την πραγματική συγκέντρωση παρέχει ένδειξη της απόδοσης παραγωγής του συστήματος δοκιμών και, συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό προβλημάτων παραγωγής.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: πραγματική συγκέντρωση

21. Η πραγματική συγκέντρωση ορίζεται ως η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στη ζώνη αναπνοής των ζώων σε θάλαμο εισπνοής. Οι πραγματικές συγκεντρώσεις μπορούν να επιτευχθούν με ειδικές μεθόδους (π.χ. άμεση δειγματοληψία, μέθοδοι προσρόφησης ή χημικής αντίδρασης και επακόλουθος αναλυτικός χαρακτηρισμός) είτε με μη ειδικές μεθόδους, όπως η σταθμική ανάλυση με ηθμό. Η χρήση σταθμικής ανάλυσης είναι αποδεκτή μόνο για αερολύματα σκόνης με ένα μόνο μέρος ή για αερολύματα υγρών χαμηλής πτητικότητας και θα πρέπει να υποστηρίζεται από κατάλληλους, ειδικούς για την ελεγχόμενη ουσία χαρακτηρισμούς, πριν από τη μελέτη. Η συγκέντρωση αερολυμάτων σκόνης με πολλά μέρη μπορεί επίσης να προσδιοριστεί με σταθμική ανάλυση. Ωστόσο, απαιτούνται για τον σκοπό αυτό αναλυτικά δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι η σύνθεση του αερομεταφερόμενου υλικού είναι παρόμοια με εκείνη του αρχικού υλικού. Εάν οι πληροφορίες αυτές δεν είναι διαθέσιμες, ενδέχεται να απαιτείται εκ νέου ανάλυση της ελεγχόμενης ουσίας (ιδανικά, στην αερομεταφερόμενη κατάσταση) ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Προκειμένου για ουσίες σε μορφή αερολύματος που ενδέχεται να εξατμιστούν ή να εξαχνωθούν, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι συλλέγονται όλες οι φάσεις με την επιλεχθείσα μέθοδο. Στην έκθεση της μελέτης θα πρέπει να αναφέρονται οι στοχευόμενες, οι ονομαστικές και οι πραγματικές συγκεντρώσεις, αλλά μόνο οι πραγματικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται σε στατιστικές αναλύσεις για τον υπολογισμό τιμών θανατηφόρας συγκέντρωσης.

22. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται, εάν είναι δυνατόν, μία παρτίδα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και το δοκίμιο θα πρέπει να αποθηκεύεται υπό συνθήκες που διατηρούν την καθαρότητα, την ομοιογένεια και τη σταθερότητά του. Πριν από την έναρξη της μελέτης, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να χαρακτηρίζεται ως προς την καθαρότητά της και, εάν είναι τεχνικά εφικτό, ως προς την ταυτότητα και τις ποσότητες τυχόν εντοπισθέντων ρύπων και προσμείξεων. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί, μεταξύ άλλων, από τα ακόλουθα δεδομένα: χρόνος κατακράτησης και σχετικό εμβαδόν κορυφής, μοριακό βάρος μέσω αναλύσεων φασματομετρίας μάζας ή αεριοχρωματογραφίας ή άλλες εκτιμήσεις. Παρόλο που η ταυτότητα του δοκιμίου δεν αποτελεί ευθύνη του εργαστηρίου, θα ήταν σκόπιμο να επιβεβαιώνει το εργαστήριο, έστω και σε περιορισμένη έκταση, τον χαρακτηρισμό από τον χορηγό (π.χ. χρώμα, φυσική κατάσταση κ.λπ.).

23. Η ατμόσφαιρα έκθεσης διατηρείται σταθερή στο μέτρο του εφικτού και παρακολουθείται συνεχώς και/ή κατά διαστήματα, ανάλογα με τη μέθοδο ανάλυσης. Όταν εφαρμόζεται δειγματοληψία κατά διαστήματα, θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα της ατμόσφαιρας του θαλάμου τουλάχιστον δύο φορές κατά τη μελέτη διάρκειας τεσσάρων ωρών. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, λόγω περιορισμένης ταχύτητας ροής αέρα ή χαμηλών συγκεντρώσεων, επιτρέπεται να λαμβάνεται ένα δείγμα καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Εάν εμφανίζονται αισθητές διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων,

▼M4

για τις επόμενες συγκεντρώσεις που θα υποβληθούν σε δοκιμή θα πρέπει να λαμβάνονται τέσσερα δείγματα ανά έκθεση. Τα επιμέρους δείγματα συγκέντρωσης στον θάλαμο δεν θα πρέπει να αποκλίνουν από τη μέση συγκέντρωση περισσότερο από ± 10 %, προκειμένου για αέρια και ατμούς, και ± 20 % για τα υγρά ή στερεά αερολύματα. Πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται ο χρόνος εξισορρόπησης του θαλάμου (t_{95}). Η διάρκεια της έκθεσης καλύπτει τον χρόνο παραγωγής της ελεγχόμενης ουσίας, στον οποίο λαμβάνονται υπόψη οι χρόνοι που απαιτούνται για την επίτευξη του t_{95}. Καθοδήγηση για την εκτίμηση του t_{95} παρέχεται στο έγγραφο GD 39 (2).

24. Στην περίπτωση πολύ σύνθετων μειγμάτων που αποτελούνται από αέρια/ατμούς και αερολύματα (π.χ. ατμόσφαιρες καύσης και ελεγχόμενες χημικές ουσίες εξωθούμενες από στοχοστρεφή προϊόντα/συσκευές τελικής χρήσης), κάθε φάση ενδέχεται να συμπεριφέρεται διαφορετικά στον θάλαμο εισπνοής. Συνεπώς, θα πρέπει να επιλέγεται τουλάχιστον μία ουσία-δείκτης (αναλύτης), συνήθως η κύρια δραστική ουσία του μείγματος, σε κάθε φάση (αέριο/ατμός και αερόλυμα). Όταν η ελεγχόμενη ουσία είναι μείγμα, η αναλυτική συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται για το μείγμα και όχι μόνο για τη δραστική ουσία ή το μέρος (αναλύτης). Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις πραγματικές συγκεντρώσεις παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (2).

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κατανομή μεγέθους σωματιδίων

25. Η κατανομή μεγέθους σωματιδίων των αερολυμάτων θα πρέπει να προσδιορίζεται τουλάχιστον δύο φορές κατά τη διάρκεια κάθε τετράωρης έκθεσης, με τη χρήση κρουστικού διαχωριστήρα ή εναλλακτικού οργάνου, όπως ο αεροδυναμικός κατανεμητής σωματιδίων. Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται μέσω κρουστικού διαχωριστήρα και του εναλλακτικού οργάνου, το εναλλακτικό όργανο επιτρέπεται να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Παράλληλα με το κύριο όργανο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια δεύτερη συσκευή, όπως ένα σταθμικό φίλτρο ή πλυντρίδα αερίου/φυσαλιδοδείκτης, για να επιβεβαιώνει την απόδοση συλλογής του κύριου οργάνου. Η κατά μάζα συγκέντρωση που προκύπτει από την ανάλυση μεγέθους σωματιδίων θα πρέπει να προσεγγίζει, εντός εύλογων ορίων, την κατά μάζα συγκέντρωση που λαμβάνεται με σταθμική ανάλυση [βλέπε GD 39 (2)]. Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία σε πρώιμο στάδιο της μελέτης, επιτρέπεται να παραλείπονται οι περαιτέρω επιβεβαιωτικές μετρήσεις. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε να ελαχιστοποιούνται τα ασαφή δεδομένα που ενδέχεται να δημιουργούν ανάγκη επανάληψης μιας έκθεσης. Στην περίπτωση των ατμών, η κατανομή μεγέθους σωματιδίων θα πρέπει να προσδιορίζεται, εάν υπάρχει πιθανότητα η συμπύκνωση των ατμών να οδηγήσει στον σχηματισμό αερολύματος ή εάν ανιχνευθούν σε ατμόσφαιρα ατμών σωματίδια με δυναμικό σχηματισμού μεικτών φάσεων (βλέπε παράγραφο 15).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

26. Περιγράφονται κατωτέρω δύο τύποι μελέτης: το παραδοσιακό πρωτόκολλο και το πρωτόκολλο C × t. Τα δύο πρωτόκολλα μπορούν να περιλαμβάνουν αναγνωριστική μελέτη, κυρίως μελέτη και/ή οριακή δοκιμή (παραδοσιακό πρωτόκολλο) ή δοκιμή σε οριακή συγκέντρωση (C × t). Εάν είναι γνωστό ότι ένα φύλο είναι περισσότερο ευαίσθητο, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να εκπονήσει τις μελέτες αυτές χρησιμοποιώντας μόνο το ευαίσθητο φύλο. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Πριν αρχίσει η δοκιμή, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα διαθέσιμα δεδομένα ώστε να ελαχιστοποιείται η χρήση ζώων. Παραδείγματος χάριν, τα δεδομένα που παράγονται με την εφαρμογή του κεφαλαίου B.52 του παρόντος παραρτήματος (4) ενδέχεται να εξαλείφουν την ανάγκη αναγνωριστικής μελέτης και μπορούν επίσης να καταδείξουν αν ένα φύλο είναι περισσότερο ευαίσθητο [βλέπε GD 39 (2)].

▼M4

ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Γενικές εκτιμήσεις: παραδοσιακό πρωτόκολλο

27. Σε μια παραδοσιακή μελέτη, ομάδες ζώων εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία για καθορισμένη χρονική περίοδο (συνήθως 4 ώρες) σε θάλαμο είτε ρινικής είτε ολόσωμης έκθεσης. Τα ζώα εκτίθενται είτε σε οριακή συγκέντρωση (οριακή δοκιμή) είτε σε τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις στο πλαίσιο κλιμακωτής διαδικασίας (κυρίως μελέτη). Μπορεί να προηγείται της κυρίως μελέτης μια αναγνωριστική μελέτη, εκτός εάν υπάρχουν ήδη κάποιες πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, όπως μελέτες του κεφαλαίου B.52 που έχουν εκπονηθεί στο παρελθόν [βλέπε GD 39 (2)].

Αναγνωριστική μελέτη: παραδοσιακό πρωτόκολλο

28. Αναγνωριστική μελέτη χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ισχύος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τον εντοπισμό διαφορών ευαισθησίας μεταξύ των δύο φύλων και την υποβοήθηση της επιλογής επιπέδων συγκέντρωσης έκθεσης για την κυρίως μελέτη ή την οριακή δοκιμή. Κατά την επιλογή των επιπέδων συγκέντρωσης για την αναγνωριστική μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιούνται όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων των διαθέσιμων δεδομένων (Q)SAR και δεδομένων για παρόμοιες χημικές ουσίες. Δεν πρέπει να εκτίθενται περισσότερα από τρία αρσενικά και τρία θηλυκά ζώα σε κάθε συγκέντρωση (ενδέχεται να απαιτούνται 3 ζώα/φύλο για να διαπιστωθούν διαφορές μεταξύ των δύο φύλων). Η αναγνωριστική μελέτη μπορεί να περιλαμβάνει μια μόνο συγκέντρωση, αλλά, εάν είναι απαραίτητο, μπορούν να ελεγχθούν περισσότερες συγκεντρώσεις. Κατά την αναγνωριστική μελέτη δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τόσα ζώα και συγκεντρώσεις ώστε αυτή να προσομοιάζει με κυρίως μελέτη. Αντί αναγνωριστικής μελέτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελέτη του κεφαλαίου B.52 (4) που έχει εκπονηθεί στο παρελθόν [βλέπε GD 39 (2)].

Οριακή δοκιμή: παραδοσιακό πρωτόκολλο

29. Οριακή δοκιμή χρησιμοποιείται όταν είναι γνωστό ή αναμένεται ότι η ελεγχόμενη ουσία είναι ουσιαστικά μη τοξική, ήτοι προκαλεί τοξική αντίδραση μόνο σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από τις οριακές τιμές που προβλέπονται στις νομοθετικές ρυθμίσεις. Σε μια οριακή δοκιμή, μία ομάδα τριών αρσενικών και τριών θηλυκών ζώων εκτίθεται στην ελεγχόμενη ουσία σε οριακή συγκέντρωση. Στοιχεία σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας είναι δυνατόν να συναχθούν από τα αποτελέσματα δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με ανάλογες χημικές ουσίες, λαμβάνοντας υπόψη την ταυτότητα και την εκατοστιαία αναλογία των σημαντικών από τοξικολογική άποψη συστατικών. Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας ή εάν η τελευταία αναμένεται να είναι τοξική, πρέπει να διεξάγεται η κυρίως δοκιμή.

30. Η επιλογή οριακών συγκεντρώσεων εξαρτάται συνήθως από τις κανονιστικές απαιτήσεις. Όταν εφαρμόζεται ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008, οι οριακές συγκεντρώσεις για αέρια, ατμούς και αερολύματα είναι 20 000 ppm, 20 mg/l και 5 mg/l, αντιστοίχως (ή η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση) (3). Ενδέχεται να είναι τεχνικά δύσκολο να παραχθούν οριακές συγκεντρώσεις ορισμένων ελεγχόμενων χημικών ουσιών, ιδίως ατμών και αερολυμάτων. Κατά τη διεξαγωγή δοκιμών με αερολύματα, πρωταρχικός στόχος θα πρέπει να είναι η επίτευξη εισπνεύσιμου μεγέθους σωματιδίων (MMAD 1-4 μm). Αυτό είναι εφικτό με τις περισσότερες ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε συγκέντρωση 2 mg/l. Ο έλεγχος αερολυμάτων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2 mg/l θα πρέπει να επιχειρείται μόνο εάν είναι δυνατόν να επιτευχθεί εισπνεύσιμο μέγεθος σωματιδίων [βλέπε GD 39 (2)]. Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 αποθαρρύνει τη διεξαγωγή δοκιμών πάνω από μια οριακή συγκέντρωση για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων (3). Η οριακή συγκέντρωση θα πρέπει να εξετάζεται μόνο στην περίπτωση που είναι πολύ πιθανόν τα αποτελέσματα μιας τέτοιας δοκιμής να έχουν άμεση συνάφεια με την προστασία της υγείας των ανθρώπων (3) και εφόσον παρέχεται αιτιολόγηση στην έκθεση μελέτης. Στην περίπτωση δυνητικώς εκρήξιμων ελεγχόμενων ουσιών, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται οι συνθήκες που ευνοούν εκρήξεις. Για να αποφεύγεται η περιττή χρήση ζώων, θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμαστική διαδικασία χωρίς ζώα, πριν από την οριακή δοκιμή, ώστε να εξασφαλίζεται η δυνατότητα επίτευξης των απαραιτήτων συνθηκών θαλάμου για μια οριακή δοκιμή.

▼M4

31. Εάν παρατηρούνται θνησιμότητα ή ετοιμοθάνατα ζώα στην οριακή συγκέντρωση, τα αποτελέσματα της οριακής δοκιμής μπορούν να χρησιμεύσουν ως αναγνωριστική μελέτη για περαιτέρω δοκιμές σε άλλες συγκεντρώσεις (βλέπε κυρίως μελέτη). Εάν οι φυσικές ή χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθιστούν αδύνατη την επίτευξη οριακής συγκέντρωσης, θα πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή με τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση. Εάν παρατηρείται θνησιμότητα κάτω του 50 % με τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση, δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών. Εάν δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί η οριακή συγκέντρωση, η έκθεση μελέτης της θα πρέπει να περιλαμβάνει εξηγήσεις και υποστηρικτικά δεδομένα. Εάν η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση ενός ατμού δεν προκαλεί την εκδήλωση τοξικότητας, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να παραχθεί η ελεγχόμενη ουσία ως υγρό αερόλυμα.

Κυρίως μελέτη: παραδοσιακό πρωτόκολλο

32. Η κυρίως μελέτη διεξάγεται συνήθως με τη χρήση πέντε αρσενικών και πέντε θηλυκών ζώων (ή 5 ζώων του φύλου που παρουσιάζει ευαισθησία, εάν είναι γνωστό) ανά επίπεδο συγκέντρωσης και με τουλάχιστον τρία επίπεδα συγκέντρωσης. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επαρκή επίπεδα συγκέντρωσης ώστε να πραγματοποιείται ανθεκτική στατιστική ανάλυση. Το χρονικό διάστημα μεταξύ των εκθέσεων στις οποίες υποβάλλονται οι ομάδες καθορίζεται από τον χρόνο εμφάνισης, τη διάρκεια και τη σοβαρότητα των τοξικών εκδηλώσεων. Η έκθεση των ζώων στο επόμενο επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να καθυστερεί έως ότου υπάρχει εύλογη πεποίθηση ότι τα ζώα που υποβλήθηκαν στην προηγούμενη δοκιμή θα επιβιώσουν. Με τον τρόπο αυτόν, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να προσαρμόζει ανάλογα τη συγκέντρωση στόχου για την επόμενη ομάδα έκθεσης. Λόγω της εξάρτησης από περίπλοκες τεχνολογίες, αυτό ενδέχεται να μην είναι πάντα εφικτό στην πράξη στις μελέτες εισπνοής, οπότε η έκθεση των ζώων στο επόμενο επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να βασίζεται στην προηγούμενη πείρα και σε επιστημονική κρίση. Όταν διεξάγονται δοκιμές με μείγματα, θα πρέπει να μελετάται το έγγραφο GD 39 (2).

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ «ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ × ΧΡΟΝΟΣ» (C × t)

Γενικές εκτιμήσεις: πρωτόκολλο C × t

33. Η κλιμακωτή μελέτη C × t μπορεί να εξετάζεται ως εναλλακτική λύση αντί του παραδοσιακού πρωτοκόλλου κατά την εκτίμηση της αναπνευστικής τοξικότητας (12) (13) (14). Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την έκθεση ζώων σε μια ελεγχόμενη χημική ουσία σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης και για πολλαπλά χρονικά διαστήματα. Όλες οι δοκιμές εκτελούνται σε θάλαμο ρινικής έκθεσης (οι θάλαμοι ολόσωμης έκθεσης δεν είναι εύχρηστοι για το συγκεκριμένο πρωτόκολλο). Ένα διάγραμμα ροής στο προσάρτημα 1 επεξηγεί το πρωτόκολλο αυτό. Έχει αποδειχθεί με ανάλυση προσομοίωσης ότι τόσο από το παραδοσιακό πρωτόκολλο, όσο και από πρωτόκολλο C × t μπορούν να προκύψουν ανθεκτικές τιμές LC_{50}, αλλά το πρωτόκολλο C × t γενικά υπερέχει στην παροχή ανθεκτικών τιμών LC_{01} και LC_{10} (15).

34. Έχει καταδειχθεί με ανάλυση προσομοίωσης ότι η χρήση δύο ζώων ανά διάστημα C × t (ένα ζώο ανά φύλο, εάν χρησιμοποιούνται και τα δύο φύλα, ή δύο ζώα του πλέον ευαίσθητου φύλου) γενικά επαρκεί κατά τον έλεγχο 4 συγκεντρώσεων και 5 περιόδων έκθεσης σε μια κυρίως μελέτη. Υπό ορισμένες συνθήκες, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει δύο επίμυες ανά φύλο ανά διάστημα C × t (15). Με τη χρήση 2 ζώων ανά φύλο ανά συγκέντρωση και χρονικό σημείο είναι δυνατόν να μειωθεί το συστηματικό σφάλμα και η μεταβλητότητα των εκτιμήσεων, να αυξηθεί το ποσοστό επιτυχίας της εκτίμησης και να βελτιωθεί η κάλυψη του διαστήματος εμπιστοσύνης. Ωστόσο, σε περίπτωση ανεπαρκούς προσαρμογής στα δεδομένα για την εκτίμηση (κατά τη χρήση ενός ζώου ανά φύλο ή δύο ζώων του πλέον ευαίσθητου φύλου), ενδέχεται να επαρκεί επίσης μια 5η συγκέντρωση έκθεσης. Περαιτέρω καθοδήγηση για τον αριθμό ζώων και συγκεντρώσεων που πρέπει να χρησιμοποιούνται στις μελέτες C × t παρέχεται στο έγγραφο GD 39 (2).

▼M4

Αναγνωριστική μελέτη: πρωτόκολλο C × t

35. Αναγνωριστική μελέτη χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ισχύος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την υποβοήθηση της επιλογής επιπέδων συγκέντρωσης έκθεσης για την κυρίως μελέτη. Ενδέχεται να απαιτείται αναγνωριστική μελέτη με τη χρήση τριών το πολύ ζώων/φύλο/συγκέντρωση [για λεπτομέρειες, βλέπε προσάρτημα III του εγγράφου GD 39 (2)] για την επιλογή κατάλληλης αρχικής συγκέντρωσης της κυρίως μελέτης και την ελαχιστοποίηση του αριθμού των χρησιμοποιούμενων ζώων. Μπορεί να είναι απαραίτητη η χρήση τριών ζώων ανά φύλο για την τεκμηρίωση της ύπαρξης διαφοράς μεταξύ των φύλων. Τα ζώα αυτά θα πρέπει να εκτίθενται για ένα μόνο χρονικό διάστημα, συνήθως 240 λεπτών. Θα πρέπει να εκτιμάται η εφικτότητα της δημιουργίας κατάλληλων πειραματικών ατμοσφαιρών, με τεχνικές προκαταρκτικές δοκιμές χωρίς χρήση ζώων. Γενικά, δεν απαιτείται αναγνωριστική μελέτη, εάν υπάρχουν δεδομένα θνησιμότητας από μελέτη του κεφαλαίου B.52 (4). Κατά την επιλογή της αρχικής συγκέντρωσης στόχου σε μελέτη του κεφαλαίου B.2, ο διευθυντής της μελέτης θα πρέπει να εξετάζει τα πρότυπα θνησιμότητας που έχουν παρατηρηθεί σε τυχόν διαθέσιμες μελέτες του κεφαλαίου B.52 (4) και για τα δύο φύλα και για το σύνολο των συγκεντρώσεων [βλέπε GD 39 (2)].

Αρχική συγκέντρωση: πρωτόκολλο C × t

36. Η αρχική συγκέντρωση (συνεδρία έκθεσης I) (προσάρτημα 1) θα είναι είτε μια οριακή συγκέντρωση ή μια συγκέντρωση επιλεγμένη από τον διευθυντή της μελέτης βάσει της αναγνωριστικής μελέτης. Ομάδες 1 ζώου/φύλο εκτίθενται στη συγκέντρωση αυτή για διάφορα χρονικά διαστήματα (π.χ. 15, 30, 60, 120 ή 240 λεπτά), έως ότου υποβληθούν σε δοκιμή 10 ζώα συνολικά (συνεδρία έκθεσης I) (προσάρτημα 1).

37. Η επιλογή οριακών συγκεντρώσεων εξαρτάται συνήθως από τις κανονιστικές απαιτήσεις. Όταν εφαρμόζεται ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008, οι οριακές συγκεντρώσεις για αέρια, ατμούς και αερολύματα είναι 20 000 ppm, 20 mg/l και 5 mg/l, αντιστοίχως (ή η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση) (3). Ενδέχεται να είναι τεχνικά δύσκολο να παραχθούν οριακές συγκεντρώσεις ορισμένων ελεγχόμενων χημικών ουσιών, ιδίως ατμών και αερολυμάτων. Κατά τη διεξαγωγή δοκιμών με αερολύματα, στόχος θα πρέπει να είναι η επίτευξη εισπνεύσιμου μεγέθους σωματιδίων (MMAD 1-4 μm) σε οριακή συγκέντρωση 2 mg/l. Αυτό είναι εφικτό με τις περισσότερες ελεγχόμενες χημικές ουσίες. Ο έλεγχος αερολυμάτων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2 mg/l θα πρέπει να επιχειρείται μόνο εάν μπορεί να επιτευχθεί εισπνεύσιμο μέγεθος σωματιδίων [βλέπε GD 39 (2)]. Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 αποθαρρύνει τη διεξαγωγή δοκιμών πάνω από μια οριακή συγκέντρωση για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων (3). Το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμών σε συγκεντρώσεις άνω της οριακής συγκέντρωσης θα πρέπει να εξετάζεται μόνο εφόσον είναι πολύ πιθανόν τα αποτελέσματα μιας τέτοιας δοκιμής να έχουν άμεση συνάφεια με την προστασία της ανθρώπινης υγείας (3) και πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση στην έκθεση της μελέτης. Στην περίπτωση των δυνητικώς εκρήξιμων ελεγχόμενων ουσιών, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται οι συνθήκες που ευνοούν εκρήξεις. Για να αποφεύγεται η περιττή χρήση ζώων, θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμαστική διαδικασία χωρίς ζώα, πριν από τη δοκιμή με την αρχική συγκέντρωση, ώστε να εξασφαλίζεται η δυνατότητα επίτευξης των απαραιτήτων συνθηκών θαλάμου για τη συγκέντρωση αυτή.

38. Εάν παρατηρούνται θνησιμότητα ή ετοιμοθάνατα ζώα στην αρχική συγκέντρωση, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τη συγκέντρωση αυτή μπορούν να χρησιμεύσουν ως αφετηρία για περαιτέρω δοκιμές με άλλες συγκεντρώσεις (βλέπε κυρίως μελέτη). Όταν οι φυσικές ή χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθιστούν αδύνατη την επίτευξη οριακής συγκέντρωσης, θα πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή με τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση. Εάν παρατηρηθεί θνησιμότητα κάτω του 50 % με τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση, δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών. Εάν δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί η οριακή συγκέντρωση, η έκθεση της μελέτης θα πρέπει να περιλαμβάνει εξηγήσεις και υποστηρικτικά δεδομένα. Εάν η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση ενός ατμού δεν προκαλεί την εκδήλωση τοξικότητας, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να παραχθεί η ελεγχόμενη ουσία ως υγρό αερόλυμα.

▼M4

Κυρίως μελέτη: πρωτόκολλο C × t

39. Η αρχική συγκέντρωση (συνεδρία έκθεσης I) (προσάρτημα 1) που ελέγχεται στην κυρίως μελέτη θα είναι είτε οριακή συγκέντρωση είτε συγκέντρωση επιλεγμένη από το διευθυντή της μελέτης βάσει της αναγνωριστικής μελέτης. Εάν έχει παρατηρηθεί θνησιμότητα κατά τη διάρκεια της συνεδρίας έκθεσης I ή έπειτα από αυτήν, η ελάχιστη έκθεση C × t που οδηγεί σε θνησιμότητα θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως οδηγός για τον καθορισμό της συγκέντρωσης και των περιόδων έκθεσης για τη συνεδρία έκθεσης II. Κάθε επόμενη συνεδρία έκθεσης θα εξαρτάται από την προηγούμενη (βλέπε προσάρτημα 1).

40. Για πολλές ελεγχόμενες χημικές ουσίες, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με την αρχική συγκέντρωση, σε συνδυασμό με τρεις πρόσθετες συνεδρίες έκθεσης με μικρότερη χρονική κάναβο (δηλαδή γεωμετρική απόσταση των περιόδων έκθεσης, όπως δηλώνεται από τον συντελεστή μεταξύ διαδοχικών περιόδων, συνήθως √2), επαρκούν για τον προσδιορισμό της σχέσης θνησιμότητας C × t (15), αλλά ενδέχεται να προκύπτουν πλεονεκτήματα από τη χρήση μιας 5ης συγκέντρωσης έκθεσης [βλέπε προσάρτημα 1 και GD 39 (2)]. Για τη μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων στην περίπτωση του πρωτοκόλλου C × t, βλέπε προσάρτημα 1.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

41. Τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται συχνά σε κλινική παρατήρηση κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Έπειτα από την έκθεση, τα ζώα υποβάλλονται σε κλινική παρατήρηση τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα της έκθεσης ή συχνότερα, εάν είναι αναγκαίο, ανάλογα με την αντίδραση των ζώων στην αγωγή, και στη συνέχεια, τουλάχιστον μια φορά ημερησίως για 14 ημέρες συνολικά. Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης δεν είναι σταθερή, αλλά θα πρέπει να καθορίζεται βάσει της φύσης και του χρόνου εμφάνισης κλινικών συμπτωμάτων, καθώς και της διάρκειας της περιόδου ανάρρωσης. Ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των τοξικών εκδηλώσεων είναι σημαντικός, ιδίως εάν παρατηρείται τάση καθυστερημένης εμφάνισης τοξικών εκδηλώσεων. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά και χωριστά για κάθε ζώο. Ζώα ετοιμοθάνατα ή που παρουσιάζουν έντονο πόνο και/ή επίμονη σοβαρή δυσφορία πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Κατά την εξέταση για κλινικά σημεία τοξικότητας πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα, ώστε αρχική κακή όψη και οι παροδικές αλλαγές στην αναπνοή, που οφείλονται στη διαδικασία της έκθεσης, να μην εκλαμβάνονται εσφαλμένα ως τοξικότητα συνδεόμενη με την ελεγχόμενη χημική ουσία, η οποία θα επέβαλλε πρόωρη θανάτωση των ζώων. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι αρχές και τα κριτήρια που συνοψίζονται στο έγγραφο καθοδήγησης για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (GD 19) (7). Ο χρόνος θανάτου των ζώων που θανατώνονται προκειμένου να μην ταλαιπωρηθούν ή βρίσκονται νεκρά θα πρέπει να καταγράφεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

42. Οι παρατηρήσεις στον κλωβό θα πρέπει να περιλαμβάνουν τις αλλαγές στο δέρμα και το τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, καθώς και στο αναπνευστικό, το κυκλοφοριακό, το αυτόνομο και το κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Όταν είναι δυνατό, θα πρέπει να σημειώνεται τυχόν διαφοροποίηση μεταξύ τοπικών και συστημικών επιδράσεων. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην παρατήρηση τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του ορθού μπορεί να παρέχει υποστηρικτικά αποδεικτικά στοιχεία αντανακλαστικής βραδύπνοιας ή υποθερμίας/υπερθερμίας που σχετίζεται με την αγωγή ή τη στέρηση της ελευθερίας.

Βάρος σώματος

43. Το βάρος του κάθε ζώου θα πρέπει να καταγράφεται μία φορά κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού, την ημέρα της έκθεσης πριν από την έκθεση (ημέρα 0) και τουλάχιστον την 1η, την 3η και την 7η ημέρα (και, στη συνέχεια, εβδομαδιαίως), καθώς και κατά τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας, εάν επέρχεται μετά την 1η ημέρα. Το σωματικό βάρος θεωρείται κρίσιμος δείκτης τοξικότητας και, συνεπώς, τα ζώα που εμφανίζουν σταθερή μείωσή του κατά ≥ 20 % σε σύγκριση με τις τιμές πριν από τη μελέτη θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά. Τα επιζώντα ζώα ζυγίζονται και θανατώνονται με ευθανασία στο τέλος της περιόδου μετά την έκθεση.

▼M4

Παθολογική ανατομική

44. Όλα τα πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένων όσων πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώνονται με ευθανασία και αποσύρονται από τη μελέτη για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, υποβάλλονται σε νεκροψία. Εάν δεν μπορεί να διενεργηθεί νεκροψία αμέσως μετά την ανακάλυψη κάποιου νεκρού ζώου, το ζώο θα πρέπει να ψύχεται (όχι να καταψύχεται) σε θερμοκρασίες αρκετά χαμηλές ώστε να ελαχιστοποιείται η αυτόλυση. Η νεκροψία θα πρέπει να διενεργείται όσο το δυνατόν συντομότερα, κατά κανόνα εντός μιας ή δύο ημερών. Όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις θα πρέπει να καταγράφονται για κάθε ζώο, με ιδιαίτερη προσοχή σε τυχόν αλλοιώσεις της αναπνευστικής οδού.

45. Επιπλέον εξετάσεις, που πρέπει να συμπεριλαμβάνονται εκ των προτέρων στον σχεδιασμό, μπορούν να διευρύνουν την ερμηνευτική αξία της μελέτης, όπως μέτρηση του βάρους των πνευμόνων των επιζώντων επιμύων και/ή παροχή αποδεικτικών στοιχείων ερεθισμού μέσω μικροσκοπικής εξέτασης της αναπνευστικής οδού. Μεταξύ των εξεταζόμενων οργάνων μπορούν επίσης να περιλαμβάνονται αυτά που εμφανίζουν μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις στα ζώα που επιζούν 24 ή περισσότερες ώρες και τα όργανα που είναι γνωστό ή αναμένεται ότι θα προσβληθούν. Ενδέχεται να προκύπτουν χρήσιμα στοιχεία από τη μικροσκοπική εξέταση ολόκληρης της αναπνευστικής οδού για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες που αντιδρούν με το νερό, όπως οξέα και υγροσκοπικές χημικές ουσίες.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

46. Θα πρέπει να παρέχονται ατομικά στοιχεία για το βάρος των ζώων και τα ευρήματα της νεκροψίας. Τα δεδομένα κλινικής παρατήρησης πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των χρησιμοποιηθέντων ζώων, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν συγκεκριμένες τοξικές εκδηλώσεις, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και χρονική εξέλιξη των τοξικών επιδράσεων, αναστρεψιμότητα και ευρήματα της νεκροψίας.

Έκθεση δοκιμής

47. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Πειραματόζωα και ζωοτεχνία

— περιγραφή των συνθηκών στέγασης σε κλωβούς, συμπεριλαμβανομένων των εξής: αριθμός (ή μεταβολή στον αριθμό) ζώων ανά κλωβό, στρωμνή, θερμοκρασία και σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, φωτοπερίοδος και προσδιορισμός του σιτηρεσίου,

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης άλλου είδους πέραν του επίμυ,

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων,

— μέθοδο τυχαιοποίησης,

— λεπτομερή στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού (συμπεριλαμβανομένων του είδους και της πηγής του σιτηρεσίου και της πηγής του νερού),

— περιγραφή τυχόν προετοιμασίας πριν από τη δοκιμή, συμπεριλαμβανομένων του σιτηρεσίου, της περιόδου υγειονομικής απομόνωσης και της αγωγής για ασθένειες.

▼M4

Ελεγχόμενη χημική ουσία

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, κατά περίπτωση, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης),

— στοιχεία ταυτότητας και αριθμός μητρώου Chemical Abstract Services (CAS), εάν είναι γνωστός.

Φορέας

— αιτιολόγηση της χρήσης φορέα και της επιλογής του φορέα (εάν δεν είναι το νερό),

— προϋπάρχοντα ή παράλληλα δεδομένα που καταδεικνύουν ότι ο φορέας δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της μελέτης.

Θάλαμος εισπνοής

— περιγραφή του θαλάμου εισπνοής, συμπεριλαμβανομένων των διαστάσεων και του όγκου,

— πηγή και περιγραφή του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την έκθεση των ζώων, καθώς και για τη δημιουργία της ατμόσφαιρας,

— εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας, του μεγέθους σωματιδίων και της πραγματικής συγκέντρωσης,

— πηγή αέρα και επεξεργασία του παρεχόμενου/απαγόμενου αέρα και σύστημα κλιματισμού που χρησιμοποιήθηκε,

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του εξοπλισμού ώστε να εξασφαλίζεται ομοιογενής πειραματική ατμόσφαιρα,

— διαφορά πίεσης (θετική ή αρνητική),

— θύρες έκθεσης ανά θάλαμο (ρινική έκθεση)· θέση των ζώων στο σύστημα (ολόσωμη έκθεση),

— χρονική ομοιογένεια/σταθερότητα της πειραματικής ατμόσφαιρας,

— θέση των αισθητήρων θερμοκρασίας και υγρασίας και δειγματοληψία της πειραματικής ατμόσφαιρας στον θάλαμο,

— ταχύτητες ροής αέρα, ταχύτητα ροής αέρα/θύρα έκθεσης (ρινική έκθεση) ή φορτίο ζώων/θάλαμο (ολόσωμη έκθεση),

— πληροφορίες για τον εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα, κατά περίπτωση,

— χρόνος που απαιτήθηκε για την επίτευξη ισορροπίας στον θάλαμο εισπνοής (t_{95}),

— αριθμός αλλαγών όγκου ανά ώρα,

— συσκευές μέτρησης (κατά περίπτωση).

Δεδομένα έκθεσης

— αιτιολόγηση της επιλογής της συγκέντρωσης στόχου στην κυρίως μελέτη,

— ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική μάζα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που παράγεται μέσα στον θάλαμο εισπνοής διά του όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του θαλάμου),

— πραγματικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που ελήφθησαν από τη ζώνη αναπνοής των ζώων· για μείγματα που παράγουν ετερογενείς φυσικές μορφές (αέρια, ατμούς, αερολύματα), καθεμιά μπορεί να αναλύεται χωριστά,

▼M4

— όλες οι ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αναφέρονται σε μονάδες μάζας (π.χ. mg/l, mg/m^3 κ.λπ.)· μπορούν επίσης να αναφέρονται παρενθετικά μονάδες όγκου (π.χ. ppm, ppb κ.λπ.),

— κατανομή μεγέθους σωματιδίων, διάμεσος αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) και γεωμετρική τυπική απόκλιση (σg), συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων υπολογισμού τους. Θα πρέπει να αναφέρονται οι επιμέρους αναλύσεις μεγέθους σωματιδίων.

Συνθήκες δοκιμής

— λεπτομερή στοιχεία για το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένων λεπτομερειών σχετικά με τις διαδικασίες που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν για τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων στερεών υλικών ή για την παρασκευή διαλυμάτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στις περιπτώσεις που μηχανικές διεργασίες ενδέχεται να έχουν αλλοιώσει τη σύνθεση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, πρέπει να περιλαμβάνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων για την επαλήθευση της σύνθεσης της ελεγχόμενης ουσίας,

— περιγραφή (κατά προτίμηση συνοδευόμενη από διάγραμμα) του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας και την έκθεση των ζώων σε αυτήν,

— λεπτομερή στοιχεία για τη χημική αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε και την επικύρωση της μεθόδου (συμπεριλαμβανομένης της απόδοσης ανάκτησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το μέσο δειγματοληψίας),

— αιτιολόγηση της επιλογής των συγκεντρώσεων δοκιμής.

Αποτελέσματα

— πίνακας με τη θερμοκρασία, την υγρασία και τη ροή αέρα στον θάλαμο,

— πίνακας με τα δεδομένα ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων στον θάλαμο,

— πίνακας με τα δεδομένα μεγέθους σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων για τη συλλογή του δείγματος ανάλυσης, της κατανομής μεγέθους σωματιδίων και των υπολογισμών της MMAD και της σ_g,

— πίνακας με τα δεδομένα απόκρισης και το επίπεδο συγκέντρωσης για κάθε ζώο (δηλαδή ζώα που παρουσίασαν εκδηλώσεις τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων της θνησιμότητας, καθώς και της φύσης, της σοβαρότητας, του χρόνου εμφάνισης και της διάρκειας των επιδράσεων),

— για κάθε ζώο, το βάρος που μετρήθηκε κατά τη μελέτη· ημερομηνία και χρόνος θανάτου, εάν επήλθε πριν από την προγραμματισμένη ευθανασία, χρόνος εμφάνισης και χρονική εξέλιξη των εκδηλώσεων τοξικότητας και το κατά πόσον αυτές ήταν αναστρέψιμες, για κάθε ζώο,

— ευρήματα νεκροψίας και ιστοπαθολογικά ευρήματα για καθένα από τα ζώα, εφόσον διατίθενται,

— εκτιμήσεις θνησιμότητας (π.χ. LC_{50}, LD_{01}), συμπεριλαμβανομένων των ορίων εμπιστοσύνης 95 % και της κλίσης (αν παρέχεται από τη μέθοδο αξιολόγησης),

— στατιστική σχέση, συμπεριλαμβανομένης εκτίμησης για τον εκθέτη n (πρωτόκολλο C × t). Θα πρέπει να αναφέρεται το όνομα του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε.

▼M4

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

— ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δίδεται στην περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπλήρωση των κριτηρίων της παρούσας μεθόδου δοκιμών, π.χ. της οριακής συγκέντρωσης ή του μεγέθους σωματιδίων,

— θα πρέπει να καλύπτεται το ζήτημα της εισπνευσιμότητας των σωματιδίων βάσει των συνολικών ευρημάτων, ιδίως εάν τα σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων κριτήρια δεν ήταν δυνατό να εκπληρωθούν,

— θα πρέπει να παρέχονται εξηγήσεις σε περίπτωση που χρειάστηκε να θανατωθούν με ευθανασία ζώα τα οποία εμφάνιζαν πόνο ή έντονη και διαρκή δυσφορία, βάσει των κριτηρίων του εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (8),

— εάν διακόπηκε η διεξαγωγή δοκιμών βάσει του κεφαλαίου Β.52 του παρόντος παραρτήματος (4) και προτιμήθηκε η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.2, πρέπει να αναφέρεται σχετική αιτιολόγηση,

— η συνολική αξιολόγηση της μελέτης πρέπει να περιλαμβάνει τη συνέπεια των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων και τη σχέση της πραγματικής προς την ονομαστική συγκέντρωση,

— θα πρέπει να αναφέρεται η πιθανή αιτία θανάτου και ο επικρατέστερος τρόπος δράσης (συστημική δράση έναντι τοπικής).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (2009), Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(3) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 (ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1).

(4) Κεφάλαιο Β.52 του παρόντος παραρτήματος: Οξεία αναπνευστική τοξικότητα — Μέθοδος των κλάσεων οξείας τοξικότητας (ΑΤC).

(5) Κεφάλαιο Β.40 του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER).

(6) Κεφάλαιο Β.40α του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή σε μοντέλο ανθρώπινου δέρματος.

(7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion, OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(9) SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT), Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests, *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

(10) Phalen R.F. (2009), Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn J. και Thiel A. (2007), A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers, *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167.

(12) Zwart J.H.E., Arts J.M., ten Berge W.F., Appelman L.M. (1992), Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing, *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15: 278-290.

(13) Zwart J.H.E., Arts J.M., Klokman-Houweling E.D., Schoen E.D. (1990), Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values, *Inhal. Toxicol.* 2: 105-117.

(14) Ten Berge W.F. και Zwart A. (1989), More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing, *J. Haz. Mat.* 21: 65-71.

(15) OECD (2009), Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(16) Finney D.J. (1977), Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M4

Προσάρτημα 1

Πρωτόκολλο C × t

1. Η κλιμακωτή μελέτη «Συγκέντρωση × Χρόνος» (C × t) μπορεί να εξετάζεται ως εναλλακτική λύση του παραδοσιακού πρωτοκόλλου για την αξιολόγηση της αναπνευστικής τοξικότητας (12) (13) (14). Θα πρέπει, κατά προτίμηση, να διεξάγεται όταν υπάρχει συγκεκριμένη κανονιστική ή επιστημονική ανάγκη που υπαγορεύει την υποβολή ζώων σε δοκιμές για πολλαπλά χρονικά διαστήματα, όπως για τον σχεδιασμό της αντιμετώπισης έκτακτων καταστάσεων ή για χωροταξικό σχεδιασμό. Η προσέγγιση αυτή αρχίζει συνήθως με δοκιμή σε μια οριακή συγκέντρωση (συνεδρία έκθεσης I), κατά την οποία ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία για πέντε χρονικά διαστήματα (π.χ. 15, 30, 60, 120 και 240 λεπτά). Έτσι επιτυγχάνονται πολλαπλά χρονικά διαστήματα με μια συνεδρία έκθεσης (βλ Σχήμα 1). Όταν εφαρμόζεται ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008, οι οριακές συγκεντρώσεις για αέρια, ατμούς και αερολύματα είναι 20 000 ppm, 20 mg/l και 5 mg/l, αντιστοίχως. Υπέρβαση των επιπέδων αυτών επιτρέπεται μόνο εάν υπάρχει κανονιστική ή επιστημονική ανάγκη διεξαγωγής δοκιμών σε αυτά τα επίπεδα (βλέπε παράγραφο 37 του κυρίως κειμένου του κεφαλαίου B.2).

2. Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θα πρέπει να διεξάγεται αναγνωριστική μελέτη, κατά την οποία ομάδες που δεν υπερβαίνουν τα τρία ζώα ανά φύλο, εκτίθενται στις συγκεντρώσεις στόχου που έχουν επιλεγεί από τον διευθυντή της μελέτης, συνήθως για 240 λεπτά.

3. Εάν ελεγχθεί μια οριακή συγκέντρωση κατά τη συνεδρία έκθεσης I και παρατηρηθεί θνησιμότητα κατώτερη του 50 %, δεν απαιτείται επιπλέον δοκιμή. Εάν υπάρχει κανονιστική ή επιστημονική ανάγκη προσδιορισμού της σχέσης συγκέντρωσης-χρόνου-απόκρισης σε επίπεδα υψηλότερα της υποδεικνυόμενης οριακής συγκέντρωσης, η επόμενη έκθεση θα πρέπει να πραγματοποιείται σε υψηλότερο επίπεδο, π.χ. διπλάσιο της οριακής συγκέντρωσης (δηλαδή 2L στο σχήμα 1).

4. Εάν παρατηρηθεί τοξικότητα στην οριακή συγκέντρωση, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή επιπλέον δοκιμής (κυρίως μελέτη). Αυτές οι επιπλέον εκθέσεις πραγματοποιούνται είτε σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (στο σχήμα 1: συνεδρίες έκθεσης II, III ή IV) ή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις με τη χρήση μικρότερων χρονικών περιόδων (στο σχήμα 1: συνεδρία έκθεσης IV), οι οποίες είναι προσαρμοσμένες και δεν απέχουν τόσο πολύ μεταξύ τους.

5. Η δοκιμή (αρχική συγκέντρωση και επιπρόσθετες συγκεντρώσεις) εκτελείται με 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή ή με 2 ζώα του πλέον ευαίσθητου φύλου ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή. Υπό ορισμένες συνθήκες, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει 2 επίμυες ανά φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή (ή 4 ζώα του ευαίσθητου φύλου ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή) (15). Με τη χρήση 2 ζώων ανά φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή μειώνονται, γενικά, το συστηματικό σφάλμα και η μεταβλητότητα των εκτιμήσεων, αυξάνεται το ποσοστό επιτυχίας της εκτίμησης και βελτιώνεται η κάλυψη του διαστήματος εμπιστοσύνης που αφορά το περιγραφόμενο πρωτόκολλο. Περισσότερες λεπτομέρειες παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (2).

6. Σε ιδανικές συνθήκες, κάθε συνεδρία έκθεσης ολοκληρώνεται σε μία ημέρα. Με τον τρόπο αυτόν είναι δυνατή η καθυστέρηση της επόμενης έκθεσης έως ότου υπάρξει εύλογη πεποίθηση ότι τα ζώα θα επιβιώσουν, ενώ ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να προσαρμόζει τη συγκέντρωση στόχου και τη χρονική διάρκεια για την επόμενη συνεδρία έκθεσης. Συνιστάται να αρχίζει κάθε συνεδρία έκθεσης με την ομάδα που θα εκτεθεί για το μεγαλύτερο διάστημα, π.χ. την ομάδα έκθεσης 240 λεπτών, ακολουθούμενη από την ομάδα έκθεσης 120 λεπτών κ.ο.κ. Εάν, παραδείγματος χάριν, τα ζώα της ομάδας των 240 λεπτών πεθάνουν μετά από 90 λεπτά ή παρουσιάσουν σοβαρές εκδηλώσεις τοξικότητας (π.χ. ακραίες αλλαγές στο αναπνευστικό πρότυπο, όπως η εργώδης αναπνοή), δεν έχει νόημα να εκτεθεί μια ομάδα για 120 λεπτά, διότι η θνησιμότητα θα είναι μάλλον 100 %. Συνεπώς, ο διευθυντής της μελέτης θα πρέπει να επιλέξει μικρότερες περιόδους έκθεσης για τη συγκέντρωση αυτή (π.χ. 90, 65, 45, 33 και 25 λεπτά).

▼**M4**

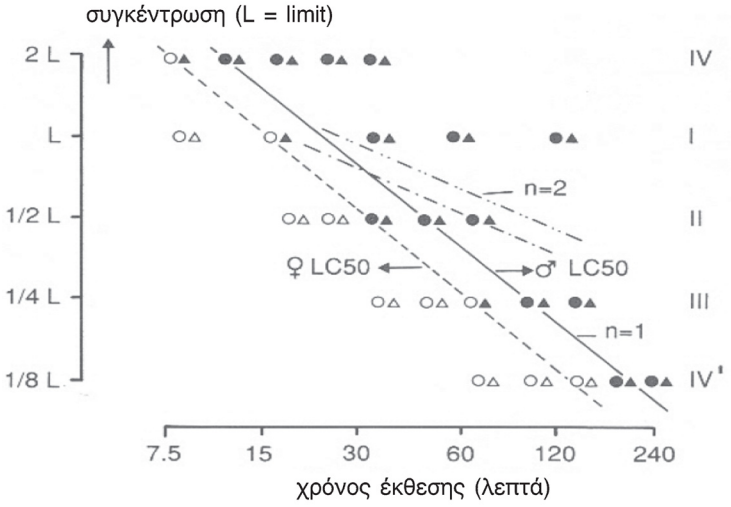
7. Η συγκέντρωση στον θάλαμο θα πρέπει να μετράται συχνά ώστε να προσδιορίζεται η σταθμισμένη ως προς τον χρόνο μέση συγκέντρωση για κάθε περίοδο έκθεσης. Όταν είναι δυνατό, θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη στατιστική ανάλυση ο χρόνος θανάτου κάθε ζώου (αντί της περιόδου έκθεσης).

8. Θα πρέπει να εξετάζονται τα αποτελέσματα των πρώτων τεσσάρων συνεδριών έκθεσης, ώστε να προσδιορίζονται τυχόν κενά στα δεδομένα της καμπύλης συγκέντρωσης-χρόνου (βλέπε σχήμα 1). Σε περίπτωση ανεπαρκούς προσαρμογής της καμπύλης στα δεδομένα, μπορεί να πραγματοποιηθεί μια επιπρόσθετη έκθεση (5η συγκέντρωση). Η συγκέντρωση και τα χρονικά διαστήματα για την 5η έκθεση θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να καλύπτουν τα κενά των δεδομένων.

9. Όλες οι συνεδρίες έκθεσης (συμπεριλαμβανομένης της πρώτης) χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχέσης συγκέντρωσης-χρόνου-απόκρισης μέσω στατιστικής ανάλυσης (16). Εάν είναι δυνατόν, για κάθε διάστημα C × t, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται η σταθμισμένη ως προς τον χρόνο μέση συγκέντρωση και η διάρκεια έκθεσης έως τον θάνατο (εάν επήλθε θάνατος κατά τη διάρκεια της έκθεσης).

Σχήμα 1

Υποθετική απεικόνιση μιας σχέσης συγκέντρωσης-χρόνου-θνησιμότητας σε επίμυες



Λευκά σύμβολα = επιζώντα ζώα· μαύρα σύμβολα = νεκρά ζώα

Τρίγωνα = θηλυκά· κύκλοι = αρσενικά

Συνεχής γραμμή = τιμές LC_{50} (εύρος 7,5-240 λεπτά) για αρσενικά ζώα με n = 1

Διακεκομμένη γραμμή = τιμές LC_{50} (εύρος 7,5-240 λεπτά) για θηλυκά ζώα με n = 1

Γραμμή με κουκίδες = υποθετικές τιμές LC_{50} για αρσενικά και θηλυκά ζώα, εάν n = 2 (12)

Γλωσσάριο

συγκέντρωση:

χρόνος έκθεσης:

▼M4

10. Ακολούθως παρατίθεται παράδειγμα της κλιμακωτής διαδικασίας:

Συνεδρία έκθεσης I — Δοκιμή στην οριακή συγκέντρωση (βλέπε σχήμα 1)

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά (α)

— Επιδιωκόμενη συγκέντρωση (β) = οριακή συγκέντρωση.

— Πέντε ομάδες ζώων εκτίθενται σε αυτή την επιδιωκόμενη συγκέντρωση για διαστήματα 15, 30, 60, 120 και 240 λεπτών, αντιστοίχως.

↓

Συνεδρία έκθεσης II (γ) — Κυρίως μελέτη

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

— Πέντε ομάδες ζώων εκτίθενται σε χαμηλότερη συγκέντρωση (δ) (1/2L) για ελαφρώς μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή √2· βλέπε σχήμα 1).

↓

Συνεδρία έκθεσης III — Κυρίως μελέτη

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

— Πέντε ομάδες ζώων εκτίθενται σε χαμηλότερη συγκέντρωση (δ) (1/4L) για ελαφρώς μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή √2· βλέπε σχήμα 1).

↓

Συνεδρία έκθεσης IV' — Κυρίως μελέτη

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

— Πέντε ομάδες ζώων εκτίθενται σε χαμηλότερη συγκέντρωση (δ) (1/8L) για ελαφρώς μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή √2· βλέπε σχήμα 1).

↓ **ή**

(α) Εάν δεν υπάρχουν πληροφορίες για ευαισθησία ανάλογα με το φύλο, χρησιμοποιούνται επίμυες και των δύο φύλων, ήτοι 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση. Βάσει των διαθέσιμων πληροφοριών ή εάν καταστεί προφανές κατά τη συγκεκριμένη συνεδρία έκθεσης ότι ένα φύλο παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία, χρησιμοποιούνται 10 ζώα του ευαίσθητου φύλου (2 ζώα ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή) σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης κατά τη διάρκεια των επόμενων δοκιμών.

(β) Όταν εφαρμόζεται ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008, οι οριακές συγκεντρώσεις για αέρια, ατμούς και αερολύματα είναι 20 000 ppm, 20 mg/l και 5 mg/l, αντιστοίχως. Σε περίπτωση αναμενόμενης τοξικότητας ή βάσει των αποτελεσμάτων της αναγνωριστικής μελέτης, θα πρέπει να επιλέγονται χαμηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις. Εάν υπάρχουν κανονιστικές ή επιστημονικές ανάγκες, μπορούν να χρησιμοποιούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις.

(γ) Σε ιδανικές συνθήκες, η έκθεση των ζώων στο επόμενο επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να καθυστερεί έως ότου υπάρξει εύλογη πεποίθηση ότι τα ζώα που υποβλήθηκαν στην προηγούμενη δοκιμή θα επιβιώσουν. Με τον τρόπο αυτόν, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να προσαρμόζει ανάλογα τη συγκέντρωση στόχου και τις περιόδους έκθεσης για την επόμενη συνεδρία έκθεσης.

(δ) Η ελάχιστη δόση (συγκέντρωση × χρόνος) που προκαλεί θνησιμότητα κατά τη διάρκεια της δοκιμής με την αρχική συγκέντρωση (πρώτη συνεδρία έκθεσης) χρησιμοποιείται ως οδηγός για τον προσδιορισμό του επόμενου συνδυασμού συγκέντρωσης και περιόδων έκθεσης. Κατά κανόνα, η συγκέντρωση θα υποδιπλασιάζεται (1/2L) και τα ζώα θα εκτίθενται σε ένα νέο εύρος χρόνου με λεπτότερη κάναβο, με γεωμετρική πρόοδο των περιόδων έκθεσης με λόγο 1,4 (√2· βλέπε παραπομπή 11) κοντά στο χρόνο που παρατηρήθηκε το ελάχιστο επίπεδο θανατηφόρας δόσης (χρόνος × συγκέντρωση) κατά την πρώτη έκθεση. Στο ανωτέρω σχήμα (σχήμα 1), παρατηρείται θνησιμότητα στη συνεδρία έκθεσης I για πρώτη φορά στα 15 λεπτά· επομένως, στη συνεδρία έκθεσης II οι περίοδοι ορίζονται με επίκεντρο τα 30 λεπτά και είναι 15, 21, 30, 42 και 60 λεπτά. Μετά τις δύο πρώτες εκθέσεις, συνιστάται ιδιαιτέρως να απεικονίζονται τα δεδομένα σε ένα σχήμα παρόμοιο με το ανωτέρω και να ελέγχεται αν η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης και χρόνου σχηματίζει γωνία 45 μοιρών (n = 1) ή αν η σχέση συγκέντρωσης-χρόνου-απόκρισης παρουσιάζει μικρότερη (π.χ. n = 2) ή μεγαλύτερη (π.χ. n = 0,8) κλίση. Στις τελευταίες περιπτώσεις συνιστάται ιδιαιτέρως να προσαρμόζονται αναλόγως οι επόμενες συγκεντρώσεις και περίοδοι.

▼M4

Συνεδρία έκθεσης IV — Κυρίως μελέτη

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

— Πέντε ομάδες ζώων εκτίθενται σε υψηλότερη συγκέντρωση ([ε]) (2L) για ελαφρώς μικρότερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή √2· βλέπε σχήμα 1).

Μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων στην περίπτωση του πρωτοκόλλου C × t

11. Σε μια διαδικασία C × t με 4 ή 5 συγκεντρώσεις έκθεσης και πέντε περιόδους έκθεσης παράγονται 20 ή 25 σημεία δεδομένων, αντίστοιχα. Με αυτά τα σημεία δεδομένων μπορεί να υπολογιστεί η σχέση C × t μέσω στατιστικής ανάλυσης (16):

Εξίσωση 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 \, ln \, C + b_2 ln \, t$$

όπου C = συγκέντρωση και t = διάρκεια έκθεσης ή

Εξίσωση 2:

$$Response = f(C^n t)$$

όπου $n = b_1/b_2$.

Από την 1η εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί η τιμή LC_{50} για δεδομένη χρονική περίοδο (π.χ. 4 ώρες, 1 ώρα, 30 λεπτά ή οποιαδήποτε χρονική περίοδος εντός του εύρους των χρονικών περιόδων που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή) με τη χρήση P = 5 (απόκριση 50 %). Να σημειωθεί ότι ο κανόνας του Haber εφαρμόζεται μόνο όταν n = 1. Η τιμή LC_{01} μπορεί να υπολογιστεί με τη χρήση P = 2,67.

([ε]) Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να αυξηθεί η συγκέντρωση (2L) σε ένα νέο εύρος χρόνου, και πάλι με λεπτότερη κάναβο, με γεωμετρική πρόοδο των περιόδων έκθεσης με λόγο 1,4 (√2) κοντά στον χρόνο που παρατηρήθηκε το ελάχιστο επίπεδο θανατηφόρας δόσης κατά την πρώτη έκθεση. Η ελάχιστη διάρκεια έκθεσης θα πρέπει, κατά προτίμηση, να υπερβαίνει τα 5 λεπτά και η μέγιστη να μην υπερβαίνει τις 8 ώρες.

▼B

Β.3. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Α).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Β).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουδεμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η εξεταζόμενη ουσία επιτίθεται στο δέρμα σε διαβαθμισμένες δόσεις σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων, για κάθε δε ομάδα χρησιμοποιείται και μία δόση. Ακολούθως, γίνονται παρατηρήσεις των επιδράσεων και των θανάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής υποβάλλονται σε νεκροψία όπως επίσης υποβάλλονται σε νεκροψία και τα ζώα που επιζούν μετά το πέρας της δοκιμής.

Τα ζώα που εμφανίζουν έντονα και διαρκή συμπτώματα δυσφορίας και πόνου μπορεί αν χρειασθεί να θανατωθούν ανώδυνα. Δεν χρειάζεται να γίνεται χορήγηση της εξεταζόμενης ουσίας με τρόπο που είναι γνωστό ότι προκαλεί έντονο πόνο και αγωνία λόγω διαβρωτικών ή ερεθιστικών ιδιοτήτων.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Ουδέν.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προετοιμασίες**

Τα ζώα κρατούνται μέσα στους πειραματικούς κλωβούς τους, κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής, για 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία υγιή, νεαρά, ενήλικα ζώα ξεχωρίζονται τυχαία και κατανέμονται στις πειραματικές ομάδες. Περίπου 24 ώρες πριν από τη δοκιμασία, το τρίχωμα πρέπει να απομακρύνεται με τη βοήθεια ψαλιδιού ή ξυριστικής μηχανής, από την περιοχή της ράχης του κορμού των ζώων. Κατά το κούρεμα ή ξύρισμα του τριχώματος, προσοχή πρέπει να δίνεται ώστε να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος, πράγμα το οποίο μπορεί να μεταβάλει τη διαπερατότητά του. Η επιφάνεια της εφαρμογής δεν πρέπει να είναι μικρότερη από το 10 % της ολικής επιφάνειας του σώματος. Όταν δοκιμάζονται στερεά, τα οποία μπορούν να κονιοποιηθούν αν χρειάζεται, η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να υγραίνεται αρκετά με νερό ή, όπου είναι ανάγκη, με έναν κατάλληλο φορέα για να εξασφαλίζεται καλή επαφή με το δέρμα. Όταν χρησιμοποιείται φορέας, η επίδρασή του στη δίοδο της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Οι υγρές ουσίες χρησιμοποιούνται γενικά αδιάλυτες.

1.6.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.6.2.1. *Πειραματόζωα*

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο ενήλικας επίμυς ή το κουνέλι. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, για τη χρησιμοποίησή τους όμως απαιτείται αιτιολόγηση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Για κάθε φύλο, το εύρος της διαφοράς βαρών των ζώων στην αρχή της δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το ±20 % της συνιστάμενης μέσης τιμής.

▼B

1.6.2.2. *Αριθμός και φύλο*

Για κάθε επίπεδο δόσεως χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 5 ζώα. Και τα πέντε πρέπει να είναι του ιδίου φύλου. Αν χρησιμοποιούνται θηλυκά, θα πρέπει να είναι άτοκα και να μην ευρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Όπου υπάρχουν πληροφορίες ότι ένα φύλο είναι πολύ περισσότερο ευαίσθητο, η χορήγηση της ουσίας θα πρέπει να γίνεται στα ζώα αυτού του φύλου.

Σημείωση: Σε δοκιμές οξείας τοξικότητας με ζώα υψηλότερης τάξης από την τάξη των τρωκτικών, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρησιμοποίησης μικρότερου αριθμού ζώων. Οι δόσεις θα πρέπει να επιλέγονται με προσοχή ενώ θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια ώστε να μη γίνεται υπέρβαση μετρίως τοξικών δόσεων. Στις δοκιμές αυτές, θα πρέπει να αποφεύγεται να χορηγούνται θανατηφόρες δόσεις της εξεταζόμενης ουσίας.

1.6.2.3. *Επίπεδα δόσεων*

Τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να είναι επαρκή ως προς τον αριθμό, τουλάχιστον τρία, και να απέχουν μεταξύ τους αρκετά ώστε να παρέχουν ομάδες πειραματισμού με εύρος τοξικών επιδράσεων και ποσοστών θνησιμότητας. Κατά τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τα επίπεδα δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κάθε ερεθιστική ή διαβρωτική επίδραση. Τα δεδομένα θα πρέπει να είναι αρκετά για τη χάραξη καμπύλης δόσεως/αποκρίσεως και, όπου είναι δυνατόν, να δίνουν τη δυνατότητα αποδεκτού προσδιορισμού της LD_{50}.

1.6.2.4. *Οριακή δοκιμή*

Σε ομάδα 5 αρσενικών και 5 θηλυκών ζώων, μπορεί να πραγματοποιηθεί οριακή δοκιμή σε επίπεδο μιας δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος, χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται ανωτέρω. Αν παρουσιασθεί θνησιμότητα σχετιζόμενη με την ουσία, μπορεί να χρειασθεί η πραγματοποίηση πλήρους μελέτης.

1.6.2.5. *Περίοδος παρατήρησης*

Η περίοδος παρατήρησης θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 14 ημέρες. Εντούτοις, η διάρκεια των παρατηρήσεων δεν πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένη. Μπορεί να καθορίζεται από τις τοξικές επιδράσεις, την τάξη εμφανίσεώς τους και τη διάρκεια της περιόδου αναρρώσεως μπορεί έτσι να επεκτείνεται όταν αυτό θεωρηθεί αναγκαίο. Ο χρόνος εμφανίσεως και εξαφανίσεως των τοξικών συμπτωμάτων, η διάρκειά τους και ο χρόνος θανάτου είναι σημαντικά, ιδιαίτερα αν υπάρχει τάση να αργοπορούν οι θάνατοι.

1.6.3. **Διαδικασία**

Τα ζώα θα πρέπει να εγκλωβίζονται κατ' άτομο. Η εξεταζόμενη ουσία θα πρέπει να επιτίθεται ομοιόμορφα σε μια περιοχή που να αντιστοιχεί στο 10 % περίπου του συνολικού εμβαδού της επιφάνειας του σώματος. Στην περίπτωση λίαν τοξικών ουσιών, το εμβαδόν της καλυπτόμενης επιφάνειας μπορεί να είναι μικρότερο, πάντως όμως θα πρέπει να καλύπτεται η μεγαλύτερη δυνατή επιφάνεια με ένα όσο το δυνατόν λεπτότερο και πιο ομοιόμορφο στρώμα.

Η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να κρατείται σε επαφή με το δέρμα καθ' όλη τη διάρκεια της εκθέσεως των 24 ωρών, με τη βοήθεια ενός επιδέσμου από πορώδη γάζα και μια μη ερεθιστική ταινία. Η ελεγχόμενη περιοχή πρέπει, επιπλέον, να καλύπτεται με τον κατάλληλο τρόπο για να συγκρατείται ο επίδεσμος και η ελεγχόμενη ουσία και να εξασφαλίζεται έτσι η αδυναμία καταπόσεως της ουσίας από τα ζώα. Επιτρέπεται η χρήση συσκευών περιορισμού για να εμποδίζεται η κατάποση, αλλά δεν συνιστάται η μέθοδος της απόλυτης ακινησίας.

▼B

Στο τέλος της περιόδου εκθέσεως, πρέπει να απομακρύνεται το υπόλειμμα της ελεγχόμενης ουσίας, όταν αυτό είναι δυνατόν, με τη χρήση νερού ή με μια άλλη κατάλληλη μέθοδο καθαρισμού του δέρματος.

Οι παρατηρήσεις πρέπει να καταχωρούνται συστηματικά, όπως γίνονται. Πρέπει να διατηρούνται ατομικά αρχεία για κάθε ζώο. Οι παρατηρήσεις, κατά τη διάρκεια της πρώτης ημέρας, πρέπει να γίνονται συχνά. Τουλάχιστον μια φορά την ημέρα πρέπει να γίνεται μια προσεκτική κλινική εξέταση. Πρόσθετες παρατηρήσεις θα πρέπει να γίνονται καθημερινά και να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα ώστε να μειώνεται στο ελάχιστο η απώλεια των ζώων από τη μελέτη. Λ.χ. νεκροψία ή ψύξη εκείνων των ζώων που βρέθηκαν νεκρά και απομόνωση ή θανάτωση των αδύνατων και ετοιμοθάνατων ζώων.

Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις του τριχώματος, του εξεταζόμενου δέρματος, των οφθαλμών και των βλεννογόνων, όπως επίσης του αναπνευστικού, κυκλοφοριακού, αυτόνομου και κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς και αλλοιώσεις στη σωματοκινητική δραστηριότητα και του τρόπου συμπεριφοράς. Με ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να γίνονται οι παρατηρήσεις των τρόμων, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Ο χρόνος θανάτου πρέπει να καταχωρείται όσο το δυνατόν ακριβέστερα. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, όπως και αυτά που επιζούν στη λήξη της, υπόκεινται σε νεκροψία. Όλες οι μακροσκοπικά παρατηρούμενες αλλοιώσεις πρέπει να καταχωρούνται. Όπου ενδείκνυται, οι ιστοί πρέπει να λαμβάνονται για ιστοπαθολογική εξέταση.

Εκτίμηση τοξικότητας στο άλλο φύλο

Αφού συμπληρωθεί η μελέτη σε ένα φύλο, η ουσία χορηγείται σε μία τουλάχιστον ομάδα 5 ζώων του άλλου φύλου για να επιβεβαιωθεί ότι τα ζώα αυτού του φύλου δεν είναι σε σημαντικό βαθμό πιο ευαίσθητα στην εξεταζόμενη ουσία. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μπορεί να δικαιολογείται η χρήση λιγότερων ζώων. Όπου υπάρχουν σαφείς πληροφορίες ότι τα ζώα του εξεταζόμενου φύλου είναι σε σημαντικό βαθμό πιο ευαίσθητα, μπορεί να μη χρειασθεί η υποβολή σε δοκιμή ζώων του άλλου φύλου.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε πειραματική ομάδα, ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο χρόνος θανάτου για κάθε ζώο, ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν άλλα συμπτώματα τοξικότητας, περιγραφή των τοξικών επιδράσεων και τα αποτελέσματα της νεκροψίας. Τα ατομικά βάρη των ζώων πρέπει να προσδιορίζονται και να καταχωρούνται, λίγο πριν την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας ανά εβδομάδα μετά, και κατά το θάνατο. Αλλαγές στο βάρος θα πρέπει να υπολογίζονται και να καταγράφονται, εφόσον τα ζώα επιζούν περισσότερο από μία ημέρα. Τα ζώα που θανατώνονται ανώδυνα λόγω δυσφορίας και πόνου που οφείλεται στην ουσία, καταγράφονται ως θάνατοι που σχετίζονται με την ουσία. Η LD_{50} θα πρέπει να προσδιορίζεται με μια αναγνωρισμένη μέθοδο.

Η αξιολόγηση των δεδομένων πρέπει να περιλαμβάνει μια αξιολόγηση της σχέσης, αν αυτή υπάρχει, μεταξύ της έκθεσης των ζώων στην ελεγχόμενη ουσία και της συχνότητας και σοβαρότητας όλων των ανωμαλιών, όπου περιλαμβάνονται ανωμαλίες συμπεριφοράς, κλινικές ανωμαλίες, μακροσκοπικές αλλοιώσεις, αλλαγές του βάρους του σώματος, θνησιμότητα, και κάθε άλλη τοξικολογική επίδραση.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

▼B

— είδος, φυλή, πηγή, περιβαλλοντικές συνθήκες, διατροφή, κλπ.

— συνθήκες δοκιμής (συμπεριλαμβανόμενης και της μεθόδου καθαρισμού του δέρματος και του τύπου της επίδεσης: προσροφητικής ή μη προσροφητικής)

— επίπεδα δόσεων (με φορέα, εφόσον χρησιμοποιήθηκε, και συγκεντρώσεις)

— φύλο των υποβληθέντων σε δοκιμή ζώων

— καταγραφή σε πίνακα των δεδομένων απόκρισης κατά φύλο και επίπεδο έκθεσης (δηλ., ο αριθμός ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αριθμός ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, αριθμός εκτεθέντων ζώων)

— χρόνο θανάτου μετά από τη χορήγηση, λόγους και κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανώδυνη θανάτωση ζώων

— όλες τις παρατηρήσεις

— τιμή LD_{50} για το φύλο που υποβλήθηκε σε πλήρη μελέτη, προσδιορισμένη μετά από 14 ημέρες με την καθορισμένη μέθοδο υπολογισμού

— όριο αξιοπιστίας 95 % για την LD_{50} (όπου είναι δυνατόν)

— καμπύλη δόσης/θνησιμότητας και κλίση (όπου το επιτρέπει η μέθοδος προσδιορισμού)

— ευρήματα νεκροψίας

— κάθε ιστοπαθολογικό εύρημα

— αποτελέσματα οποιασδήποτε δοκιμής στο άλλο φύλο

— συζήτηση των αποτελεσμάτων (ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην επίδραση που μπορεί να έχει στην υπολογιζόμενη τιμή LD_{50} η ανώδυνη θανάτωση των ζώων)

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Δ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Ε).

▼B

Β.4. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

1. Η ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών ΤΟ 404 (2002) του ΟΟΣΑ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την ανάπτυξη της παρούσας αναπροσαρμοσμένης μεθόδου, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στις δυνατότητες βελτίωσης σε σχέση με τον προβληματισμό για τη μεταχείριση των ζώων, καθώς και στην αξιολόγηση όλων των διαθέσιμων στοιχείων σχετικά με τις ελεγχόμενες ουσίες, ώστε να μην διεξάγονται περιττές δοκιμές σε πειραματόζωα, Η μέθοδος περιλαμβάνει τη σύσταση να υποβάλλονται τα υφιστάμενα δεδομένα σε ανάλυση βάρους της μαρτυρίας, πριν από τη διεξαγωγή της περιγραφόμενης δοκιμής των ουσιών in *vivo* για διάβρωση/ερεθισμό. Εφόσον τα διαθέσιμο δεδομένα είναι ανεπαρκή, μπορούν να συμπληρώνονται με την εφαρμογή ακολουθιακού ελέγχου (1). Η συνιστώμενη στρατηγική δοκιμών περιλαμβάνει την εκτέλεση έγκυρων και αποδεκτών δοκιμασιών *in vitro* και παρατίθεται σε παράρτημα της παρούσας μεθόδου. Επιπλέον, όπου ενδείκνυται, συνίσταται η διαδοχική αντί της ταυτόχρονης εφαρμογή των τριών επιθεμάτων στο ζώο κατά την αρχική δοκιμή *in vivo*.

Προς όφελος τόσο της ορθότητας του επιστημονικού έργου, όσο και της πρόνοιας για τα ζώα, δεν θα πρέπει να διεξάγονται δοκιμές *in vivo*, πριν αξιολογηθούν, με ανάλυση βάρους της μαρτυρίας, όλα τα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με την πιθανή διαβρωτική/ερεθιστική επίδραση των ουσιών στο δέρμα. Τα εν λόγω δεδομένα περιλαμβάνουν στοιχεία από προηγούμενες μελέτες στον άνθρωπο ή/και σε πειραματόζωα, στοιχεία που υποδεικνύουν ότι μία ή περισσότερες ουσίες με ανάλογη χημική δομή ή μίγματα τέτοιων ουσιών προκαλούν διάβρωση/ερεθισμό, δεδομένα υψηλής οξύτητας ή αλκαλικότητας των ουσιών (2)(3) και αποτελέσματα έγκυρων και αποδεκτών δοκιμών *in vitro* ή ex *vivo* (4)(5)(5a). Η ανωτέρω ανάλυση αναμένεται να περιορίσει την ανάγκη διεξαγωγής δοκιμών *in vivo* για διαβρωτική/ερεθιστική επίδραση στο δέρμα, ουσιών για τις οποίες υπάρχουν ήδη επαρκή αποδεικτικά στοιχεία, προερχόμενα από άλλες μελέτες, όσον αφορά τα συγκεκριμένα δύο τελικά σημεία,

Σε παράρτημα της παρούσας μεθόδου παρατίθεται η προτιμώμενη στρατηγική διαδοχικών δοκιμών (ακολουθιακός έλεγχος), που περιλαμβάνει τη διεξαγωγή έγκυρων και αποδεκτών δοκιμών διάβρωσης/ερεθισμού *in vitro* ή *ex vivo*. Η στρατηγική αυτή διαμορφώθηκε σε ημερίδα του ΟΟΣΑ, προτάθηκε ομόφωνα από τους συνέδρους (6) και εγκρίθηκε ως συνιστώμενη στρατηγική δοκιμών στο Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης Χημικών Ουσιών (Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances/GHS) (7). Συνιστάται η εφαρμογή της εν λόγω στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών *in vivo*. Προκειμένου για νέες ουσίες, αποτελεί τη συνιστώμενη κλιμακωτή προσέγγιση για τη συλλογή επιστημονικώς ορθών στοιχείων σχετικά με τη διαβρωτική/ερεθιστική δράση των ουσιών. Στην περίπτωση των υφισταμένων ουσιών, για τις οποίες δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία όσον αφορά τη δερματική διάβρωση/ερεθισμό, η στρατηγική θα πρέπει να χρησιμοποιείται για να συμπληρωθούν τα κενά στα δεδομένα. Η εφαρμογή διαφορετικής στρατηγικής ή διαδικασίας δοκιμών ή τυχόν απόφαση να μην εφαρμοστεί κλιμακωτή προσέγγιση δοκιμών θα πρέπει να αιτιολογείται.

Εάν ο διαβρωτικός ή ερεθιστικός χαρακτήρας δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με ανάλυση βάρους της μαρτυρίας σύμφωνα με τη στρατηγική διαδοχικών δοκιμών, τότε θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμής *in vivo* (βλ. παράρτημα).

▼B

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Δερματικός ερεθισμός: είναι η πρόκληση αναστρέψιμων βλαβών του δέρματος μετά την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας για χρονικά διάστημα έως 4 ωρών.

Δερματική διάβρωση: είναι η πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης του δέρματος, συγκεκριμένα εμφανούς νεκρώσεως που διαπερνά την επιδερμίδα φθάνοντας στο χόριο, μετά την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Τυπικές διαβρωτικές αντιδράσεις είναι τα έλκη. η αιμορραγία, οι εσχάρες αίματος και, στο τέλος της παρατήρησης μετά παρέλευση 14 ημερών, ο αποχρωματισμός λόγω λευκοδερμίας, επιφάνειες με τελεία αλωπεκία και ουλές. Για την αξιολόγηση αμφίβολων βλαβών, θα πρέπει να μελετάται το ενδεχόμενο ιστοπαθολογικής εξέτασης.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Μία δόση της ελεγχόμενης ουσίας εφαρμόζεται εφάπαξ στο δέρμα ενός πειραματόζωου, ενώ το υπόλοιπο δέρμα του, που δεν έχει υποβληθεί σε αγωγή, χρησιμεύει ως μάρτυρας. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, παρατηρείται η έκταση του ερεθισμού/της διάβρωσης, βαθμολογείται και περιγράφεται λεπτομερώς με σκοπό την πλήρη αξιολόγηση των επιδράσεων. Η διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να είναι επαρκής για να εκτιμηθεί αν οι παρατηρούμενες επιδράσεις είναι αναστρέψιμες ή μη.

Τα ζώα που εμφανίζουν διαρκή σημεία έντονης δυσφορίας σε οποιοδήποτε στάδιο της δοκιμής ή/και πόνου θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία, οπότε η ουσία αξιολογείται ανάλογα. Κριτήρια για τη λήψη απόφασης σχετικά με την ευθανασία ετοιμοθάνατων ή βαρέως πασχόντων ζώων παρέχονται στη δημοσίευση (8).

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Προετοιμασία της δοκιμής *in vivo***

1.4.1.1 *Επιλογή είδους ζώων*

Το προτιμώμενο πειραματόζωο είναι το αλφικό κουνέλι και χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα κουνέλια. Η χρήση άλλων ειδών ζώων θα πρέπει να αιτιολογείται,

1.4.1.2 *Προετοιμασία των ζώων*

Ένα 24ωρο περίπου πριν από τη δοκιμή, πρέπει να αφαιρείται με κουρά το τρίχωμα από τη ραχιαία επιφάνεια του κορμού των ζώων. Η κουρά πρέπει να εκτελείται με προσοχή για να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο ζώα με υγιές, ανέπαφο δέρμα.

Μερικές φυλές κουνελιών έχουν νησίδες πυκνού τριχώματος, που είναι πιο ανεπτυγμένες ορισμένες εποχές του έτους. Οι ελεγχόμενες ουσίες δεν θα πρέπει να εφαρμόζονται σε αυτές τις επιφάνειες πυκνού τριχώματος.

1.4.1.3 *Συνθήκες στέγασης και διατροφής*

Τα ζώα πρέπει να στεγάζονται χωριστά. Για τα κουνέλια, η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι *20 °C (*±3 °C). Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12ωρο. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

▼B

1.4.2 **Διαδικασία δοκιμής**

1.4.2.1 *Εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας*

Η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να εφαρμόζεται σε μια μικρή επιφάνεια του δέρματος (περίπου 6 cm^2) και να καλύπτεται με ένα κομμάτι γάζας, το οποίο συγκρατείται στη θέση του με μη ερεθιστική ταινία. Σε περίπτωση όπου η απευθείας εφαρμογή δεν είναι εφικτή (π.χ. υγρά ή ορισμένες αλοιφές), θα πρέπει να τοποθετείται πρώτα η ελεγχόμενη ουσία στη γάζα και κατόπιν το σύνολο στο δέρμα. Το επίθεμα θα πρέπει να διατηρείται χαλαρά σε επαφή με το δέρμα με τη βοήθεια κατάλληλου ημιπερατού επίδεσμοι) σε όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Όταν η ελεγχόμενη ουσία τοποθετείται στη γάζα, το επίθεμα θα πρέπει να στερεώνεται στο δέρμα κατά τρόπον ώστε να εξασφαλίζεται καλή επαφή και ομοιόμορφη κατανομή της ουσίας στο δέρμα. Το ζώο θα πρέπει να μην μπορεί να φθάσει το επίθεμα, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος να καταπιεί/εισπνεύσει την ελεγχόμενη ουσία.

Οι υγρές ελεγχόμενες ουσίες χρησιμοποιούνται κατά κανόνα χωρίς να αραιωθούν. Όταν ελέγχονται στερεές ουσίες (που μπορούν να λειοτριβούνται, εάν κρίνεται αναγκαίο), θα πρέπει να υγραίνονται με την ελάχιστη ποσότητα νερού (ή, εάν είναι απαραίτητο, άλλου κατάλληλου φορέα) που εξασφαλίζει καλή επαφή με το δέρμα. Εφόσον χρησιμοποιείται άλλος φορέας πλην του νερού, η τυχόν επίδρασή του στο ερεθισμό του δέρματος από την ελεγχόμενη ουσία πρέπει να είναι αμελητέα.

Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, που συνήθως διαρκεί τέσσερις ώρες, τα υπολείμματα της ελεγχόμενης ουσίας θα πρέπει να απομακρύνονται, εφόσον αυτό είναι πρακτικά εφικτό, με νερό ή κατάλληλο διαλύτη, χωρίς να αλλοιώνεται η υφιστάμενη απόκριση ούτε η ακεραιότητα της επιδερμίδας.

1.4.2.2 *Επίπεδα δόσεων*

Στο σημείο δοκιμής εφαρμόζονται Εφάπαξ 0,5 ml υγρού ή 0,5 g στερεού η αλοιφής.

1.4.2.3 *Αρχική δοκιμή (Δοκιμή δερματικού ερεθισμού/διάβρωσης* in vivo *σε ένα ζώο)*

Συνιστάται θερμά να διεξάγεται η δοκιμή *in vivo* πρώτα σε ένα μόνο ζώο, ιδίως όταν υπάρχουν υπόνοιες ότι η ουσία έχει διαβρωτικές ιδιότητες, σύμφωνα και με τη στρατηγική διαδοχικών δοκιμών (Βλ. παράρτημα 1).

Οταν κρίνεται, με βάση ανάλυση βάρους της μαρτυρίας, ότι μια ουσία είναι διαβρωτική, δεν χρειάζονται περαιτέρω δοκιμές σε ζώα. Οι περισσότερες από τις ουσίες για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι διαβρωτικές δεν χρειάζεται κατά κανόνα να υποβάλλονται σε περαιτέρω δοκιμές *in vitro*. Ωστόσο, σε περίπτωση όπου θεωρείται σκόπιμο να συγκεντρωθούν συμπληρωματικά δεδομένα, επειδή τα υπάρχοντα είναι ανεπαρκή, μπορούν να διεξάγονται περιορισμένης έκτασης δοκιμές σε ζώα με την ακόλουθη προσέγγιση: Στο ζώο εφαρμόζονται διαδοχικά τρία επιθέματα κατ' ανώτατο όριο. Το πρώτο αφαιρείται μετά από τρία λεπτά. Εάν δεν παρατηρηθεί καμία σοβαρή δερματική αντίδραση, εφαρμόζεται δεύτερο επίθεμα, το οποίο αφαιρείται μετά από μία ώρα. Εάν οι παρατηρήσεις στο στάδιο αυτό υποδεικνύουν ότι η έκθεση του ζώου μπορεί να παραταθεί ανώδυνα για τέσσερις ώρες, εφαρμόζεται τρίτο επίθεμα, το οποίο αφαιρείται μετά από τέσσερις ώρες, και διαβαθμίζεται η απόκριση.

Εάν μετά οποιοδήποτε από τα τρία διαδοχικά στάδια έκθεσης παρατηρηθεί διαβρωτική επίδραση, η δοκιμή τερματίζεται αμέσως. Εάν δεν παρατηρηθεί διαβρωτική επίδραση μετά την αφαίρεση του τελευταίου επιθέματος, το ζώο παραμένει υπό παρατήρηση για 14 ημέρες, εκτός εάν εκδηλωθεί διάβρωση νωρίτερα.

▼B

Στις περιπτώσεις όπου η ελεγχόμενη ουσία δεν αναμένεται να προκαλέσει διάβρωση, αλλά ενδέχεται να είναι ερεθιστική, θα πρέπει να εφαρμόζεται ένα μόνο επίθεμα σε ένα ζώο για 4 ώρες,

1.4.2.4 *Επιβεβαιωτική δοκιμή (δοκιμή δερματικού ερεθισμού* in vivo *σε επιπλέον ζώα)*

Εάν δεν έχει παρατηρηθεί διαβρωτική επίδραση κατά την αρχική δοκιμή, η ερεθιστική ή αρνητική απόκριση θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με χρήση έως δύο επιπλέον ζώων, στο καθένα από τα οποία εφαρμόζεται ένα επίθεμα για περίοδο έκθεσης 4 ωρών. Εάν κατά την αρχική δοκιμή έχει παρατηρηθεί ερεθιστική επίδραση, η επιβεβαιωτική δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί με διαδοχική ή ταυτόχρονη έκθεση των δύο επιπλέον ζώων. Στην εξαιρετική περίπτωση όπου δεν έχει διεξαχθεί η αρχική δοκιμή, είναι δυνατόν να υποβληθούν σε αγωγή δύο ή τρία ζώα με ένα μόνον επίθεμα, το οποίο αφαιρείται μετά από 4 ώρες. Όταν χρησιμοποιούνται δύο ζώα και εμφανίζουν και τα δύο την ίδια απόκριση, δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές. Στην αντίθετη περίπτωση, υποβάλλεται στη δοκιμή και το τρίτο ζώο. Για την αξιολόγηση αμφίβολων αποκρίσεων ενδέχεται να απαιτηθούν περισσότερα ζώα.

1.4.2.5 *Περίοδος παρατήρησης*

Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης θα πρέπει να είναι επαρκής για να εκτιμηθεί πλήρως κατά πόσον οι παρατηρούμενες επιδράσεις είναι αναστρέψιμες. Παρόλα αυτά, το πείραμα θα πρέπει να τερματίζεται αμέσως μόλις το ζώο εμφανίσει διαρκή σημεία ισχυρού πόνου ή δυσφορίας. Για να κριθεί αν οι επιδράσεις είναι αναστρέψιμες, τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται για χρονικό διάστημα έως 14 ημερών μετά την αφαίρεση των επιθεμάτων. Εάν διαπιστωθεί ότι είναι αναστρέψιμες πριν παρέλθουν 14 ημέρες, το πείραμα θα πρέπει να τερματίζεται τη συγκεκριμένη στιγμή.

1.4.2.6 *Κλινικές παρατηρήσεις και διαβάθμιση των δερματικών αντιδράσεων*

Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται για σημεία ερυθήματος και οιδήματος και η οι αποκρίσεις να διαβαθμίζονται σε 60 λεπτά και, κατόπιν, σε 24, 48 και 72 ώρες από την αφαίρεση του επιθέματος. Κατά την αρχική δοκιμή σε ένα ζώο, εξετάζεται επίσης το σημείο εφαρμογής του επιθέματος αμέσως μετά την αφαίρεση του. Οι δερματικές αντιδράσεις βαθμολογούνται και καταγράφονται σύμφωνα με το σύστημα του παρακάτω πίνακα. Εάν σε 72 ώρες παρατηρηθεί βλάβη του δέρματος που δεν είναι δυνατόν να χαρακτηριστεί ερεθισμός ή διάβρωση, μπορεί να χρειάζεται να συνεχιστεί η παρατήρηση μέχρι τη 14η ημέρα για να κριθεί αν οι επιδράσεις είναι αναστρέψιμες. Εκτός από την παρατήρηση του ερεθισμού, θα πρέπει να περιγράφονται πλήρως και να καταγράφονται όλες οι τοπικές τοξικές επιδράσεις, λόγου χάριν απολίπανση του δέρματος, και οι τυχόν συστημικές δυσμενείς επιδράσεις (π.χ., στα κλινικά συμπτώματα τοξικότητας και στο βάρος του σώματος). Για τη διασαφήνιση αμφίβολων αποκρίσεων, θα πρέπει να μελετάται το ενδεχόμενο ιστοπαθολογικής εξέτασης.

Η διαβάθμιση των δερματικών αποκρίσεων είναι κατ' ανάγκην υποκειμενική. Για να διευκολυνθεί η εναρμονισμένη διαβάθμιση των δερματικών αποκρίσεων και να βοηθηθούν, αφενός τα εργαστήρια δοκιμών και, αφετέρου, το προσωπικό που εκτελεί και ερμηνεύει τις παρατηρήσεις, απαιτείται κατάλληλη εκπαίδευση του εν λόγω προσωπικού στο χρησιμοποιούμενο σύστημα βαθμολόγησης (βλ. πίνακα παρακάτω). Χρήσιμος είναι επίσης ένας εικονογραφημένος οδηγός ιεράρχησης του ερεθισμού και άλλων βλαβών του δέρματος (9).

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα της μελέτης θα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα της τελικής έκθεσης δοκιμής και να καλύπτουν όλα τα στοιχεία που απαριθμούνται στην παράγραφο 3.1.

▼B

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η βαθμολογία του δερματικού ερεθισμού θα πρέπει να αξιολογείται σε συνδυασμό με το είδος και τη σοβαρότητα των βλαβών, καθώς και με το κατά πόσον αυτές είναι αναστρέψιμες. Οι επιμέρους βαθμοί δεν αντιπροσωπεύουν ένα απόλυτο πρότυπο για τις ερεθιστικές ιδιότητες ενός υλικού, δεδομένου ότι αξιολογούνται και άλλες επιδράσεις των ελεγχόμενων ουσιών. Αντίθετα, θα πρέπει να θεωρούνται ως τιμές αναφοράς, οι οποίες πρέπει να συνεκτιμώνται με όλες τις υπόλοιπες παρατηρήσεις της μελέτης.

Κατά την αξιολόγηση των ερεθιστικών αποκρίσεων, θα πρέπει να εξετάζεται αν οι βλάβες του δέρματος είναι. αναστρέψιμες. Εφόσον αποκρίσεις όπως αλωπεκία (περιορισμένη επιφάνεια), υπερκεράτωση, υπερπλασία και απολέπιση επιμένουν μέχρι το τέλος της 14ήμερης περιόδου παρατήρησης, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να θεωρείται ερεθιστική.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1 ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει χα ακόλουθα στοιχεία:

Αιτιολόγηση της διεξαγωγής δοκιμής *in vivo*: ανάλυση βάρους της μαρτυρίας των δεδομένων που προϋπήρχαν, συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών:

— περιγραφή των σχετικών δεδομένων που έχουν προκύψει από προηγούμενες δοκιμές

— δεδομένα που προέκυψαν σε κάθε στάδιο της στρατηγικής δοκιμών

— περιγραφή των δοκιμών *in vitro* που πραγματοποιήθηκαν, με λεπτομέρειες για τις διαδικασίες και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τις ουσίες ελέγχου/αναφοράς-

— ανάλυση βάρους της μαρτυρίας προκειμένου να διεξαχθεί μελέτη *in vivo*.

Ελεγχόμενη ουσία:

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS, πηγή, καθαρότητα, γνωστές ξένες προσμίξεις, αριθμός παρτίδας)·

— σύσταση και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. pH, πτητικότητα, διαλυτότητα, σταθερότητα)·

— προκειμένου για μίγματα, σύνθεση και εκατοστιαία αναλογία των συστατικών.

Φορέας:

— στοιχεία ταυτότητας, συγκέντρωση (κατά περίπτωση), όγκος που χρησιμοποιήθηκε-

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Πειραματόζωα δοκιμής:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε, αιτιολόγηση της χρήσης άλλων ζώων αντί αλφικών κουνελιών·

— αριθμός ζώων κάθε φύλου·

— βάρος κάθε ζώου στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής·

— ηλικία κατά την έναρξη της μελέτης·

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

▼B

Συνθήκες δοκιμής:

— τεχνική προετοιμασίας του σημείου εφαρμογής των επιθεμάτων·

— λεπτομέρειες για τα υλικά των επιθεμάτων και την τεχνική εφαρμογής τους·

— λεπτομέρειες για την παρασκευή, την εφαρμογή και την απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας.

Αποτελέσματα:

— καταχώρηση σε πίνακα των βαθμών ερεθιστικής/διαβρωτικής απόκρισης για κάθε ζώο σε κάθε χρονική στιγμή μέτρησης·

— περιγραφή όλων των βλαβών που παρατηρήθηκαν·

— αναλυτική περιγραφή του είδους και της έκτασης του ερεθισμού ή της διάβρωσης που παρατηρήθηκε, καθώς και τυχόν παθολογοανατομικών ευρημάτων·

— περιγραφή άλλων δυσμενών τοπικών επιδράσεων εκτός από δερματικό ερεθισμό ή διάβρωση (π.χ, απολίπανση του δέρματος) και τυχόν συστημικών επιδράσεων.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23,410 — 429.

(2) Young, J.R., How, M J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19-26.

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, «Skin Irritation», European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in Vitro* 12, pp. 483-524.

(5a) Μέθοδος Β.40 Διάβρωση του δέρματος;.

(6) ΟΟΣΑ (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Solna, Σουηδία, 22-24 Ιανουαρίου 1996 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/background.htm)

(7) ΟΟΣΑ (1998) Εναρμονισμένο Ολοκληρωμένο Σύστημα Ταξινόμησης Κινδύνων για τις Επιδράσεις των Χημικών Ουσιών στην Υγεία του ανθρώπου και στο Περιβάλλον, το οποίο εγκρίθηκε από την 28η κοινή συνεδρίαση της επιτροπής χημικών προϊόντων και της ομάδας εργασίας για τα χημικά προϊόντα, το Νοέμβριο του 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, *(20T-2004)*. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[Διατίθεται κατόπιν αιτήσεως από τη Γραμματεία του ΟΟΣΑ].

▼B

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Ερύθημα και σχηματισμός εσχάρας

Κανένα ερύθημα	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα βοείου κρέατος) έως σχηματισμός εσχάρας που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθήματος	4

Μέγιστος δυνατός βαθμός: 4

Οίδημα

Κανένα οίδημα	0
Πολύ ελαφρό οίδημα (μόλις αντιληπτό)	1
Ελαφρό οίδημα (περιγεγραμμένα χείλη με σαφή διόγκωση)	2
Μέτριο οίδημα (διόγκωση 1 mm περίπου)	3
Σοβαρό οίδημα (διόγκωση άνω του 1 mm εκτεινόμενη πέραν της επιφάνειας έκθεσης)	4

Μέγιστος δυνατός βαθμός: 4

Για τη διασαφήνιση αμφίβολων αποκρίσεων είναι δυνατόν να γίνει ιστοπαθολογική εξέταση.

▼B

Παραρτημα

Στρατηγική διαδοχικών δοκιμών (ακολουθιακός έλεγχος) για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος

ΓΕΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ

Προς όφελος τόσο της ποιότητας του επιστημονικού έργου, όσο και της πρόνοιας για τα ζώα, έχει μεγάλη σημασία να αποφεύγεται η περιττή χρήση πειραματοζώων και να ελαχιστοποιείται η διεξαγωγή δοκιμών που είναι πιθανόν να τους προκαλέσουν σοβαρές αντιδράσεις. Πριν αντιμετωπιστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμών *in vivo*, θα πρέπει να αξιολογούνται όλα τα στοιχεία που αφορούν τις πιθανές διαβρωτικές/ερεθιστικές επιδράσεις των ουσιών στο δέρμα. Ενδέχεται να υπάρχουν ήδη μαρτυρίες που αρκούν για τη ταξινόμηση της ελεγχόμενης ουσίας από πλευράς διαβρωτικής ή ερεθιστικής για το δέρμα ικανότητας, χωρίς να χρειάζονται δοκιμές σε πειραματόζωα. Η εφαρμογή επομένως της ανάλυσης βάρους της μαρτυρίας και μιας στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών ελαχιστοποιεί την ανάγκη διεξαγωγής δοκιμών *ίη vίνο*, ιδίως εάν πιθανολογείται ότι η ουσία προκαλεί σοβαρές αντιδράσεις.

Συνιστάται η χρήση της ανάλυσης βάρους της μαρτυρίας για την αξιολόγηση των διαθέσιμων στοιχείων σχετικά με τη διάβρωση και τον ερεθισμό του δέρματος από την εκάστοτε ουσία, προκειμένου να κριθεί αν πρέπει να διεξαχθούν συμπληρωματικές μελέτες, πλην δερματικών μελετών i*η vivo,* για να βοηθήσουν στο χαρακτηρισμό των συγκεκριμένων ιδιοτήτων. Εφόσον χρειάζονται περαιτέρω μελέτες, συνιστάται η εφαρμογή της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών για τη συλλογή των σχετικών πειραματικών δεδομένων. Στην περίπτωση των ουσιών που δεν έχουν υποβληθεί αε δοκιμές στο παρελθόν, η στρατηγική διαδοχικών δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συλλογή του συνόλου δεδομένων που απαιτεί η αξιολόγηση της διαβρωτικής/ερεθιστικής για το δέρμα ικανότητας των ουσιών. Η στρατηγική δοκιμών που περιγράφεται στο παρόν παράρτημα διαμορφώθηκε σε ημερίδα του ΟΟΣΑ (I) και, στη συνέχεια, επικυρώθηκε και διευρύνθηκε στο Εναρμονισμένο Ολοκληρωμένο Σύστημα Ταξινόμησης Κινδύνων για τις Επιδράσεις των Χημικών Ουσιών στην Υγεία του ανθρώπου και στο Περιβάλλον, το οποίο εγκρίθηκε από την 28η κοινή συνεδρίαση της επιτροπής χημικών προϊόντων και της ομάδας εργασίας για τα χημικά προϊόντα, το Νοέμβριο του 1998 (2).

Η παρούσα στρατηγική διαδοχικών δοκιμών δεν αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της μεθόδου δοκιμών Β.4, αλλά έκφραση της συνιστώμενης προσέγγισης για τον προσδιορισμό των ερεθιστικών/διαβρωτικών για το δέρμα χαρακτηριστικών. Η προσέγγιση αυτή αντιπροσωπεύει, αφενός την ορθή πρακτική και, αφετέρου, ένα δεοντολογικό σημείο αναφοράς για τη διεξαγωγή δοκιμών δερματικής διάβρωσης/ερεθισμού *in vivo*. Η μεθοδολογία δοκιμών παρέχει κατευθύνσεις για τη διεξαγωγή της δοκιμής *in vivo* και συγκεφαλαιώνει τους παράγοντες που θα πρέπει να εξετάζονται πριν αρχίσει μια τέτοια δοκιμή, Η στρατηγική παρέχει μια προσέγγιση για την αξιολόγηση των διαθέσιμων δεδομένων σχετικά με τις ερεθιστικές/διαβρωτικές για το δέρμα ιδιότητες των ελεγχόμενων ουσιών, καθώς και μια κλιμακωτή προσέγγιση για τη συλλογή των σχετικών δεδομένων στην περίπτωση των ουσιών για τις οποίες χρειάζονται συμπληρωματικές δοκιμές ή δεν έχουν διεξαχθεί δοκιμές. Η εν λόγω στρατηγική υποδεικνύει, επίσης, τη διεξαγωγή, σε συγκεκριμένες περιστάσεις, έγκυρων και αποδεκτών δοκιμών *in vitro* ή *ex in vivo* για διάβρωση/ερεθισμό του δέρματος.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΤΙΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών στο πλαίσιο της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών (βλ. διάγραμμα), θα πρέπει να αξιολογούνται όλα τα διαθέσιμα στοιχεία, προκειμένου να κριθεί αν είναι αναγκαίο να διεξαχθούν δερματικές δοκιμές *in vivo*. Αν και είναι δυνατόν να προκύψουν σημαντικά στοιχεία από την αξιολόγηση μεμονωμένων παραμέτρων (π.χ. ακραίες τιμές pH), θα πρέπει παρόλα αυτά να εξετάζεται το σύνολο των διαθέσιμων στοιχείων. Προκειμένου να ληφθεί απόφαση με βάση ανάλυση βάρους της μαρτυρίας, θα πρέπει να αξιολογούνται όλα τα σημαντικά δεδομένα που αφορούν τις επιδράσεις της εκάστοτε ουσίας ή των αναλόγων της, και η απόφαση αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται. Θα πρέπει να δίδεται έμφαση πρωτίστως στα διαθέσιμα δεδομένα για τις επιδράσεις των ουσιών στον άνθρωπο και στα ζώα και, κατόπιν, στα αποτελέσματα δοκιμών *in vitro* ή *ex vivo*, Θα πρέπει να αποφεύγονται, στο μέτρο του δυνατού, οι μελέτες διαβρωτικών ουσιών *in vivo*. Οι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη στη στρατηγική δοκιμών περιλαμβάνουν:

▼B

Αξιολόγηση διαθέσιμων δεδομένων για τον άνθρωπο και τα ζώα (Στάδιο 1). Πρώτα θα πρέπει να εξετάζονται τα υφιστάμενα δεδομένα που αφορούν τον άνθρωπο, π.χ. από κλινικές μελέτες ή μελέτες επαγγελματικής έκθεσης και αναφορές περιστατικών, ή/και τα δεδομένα δοκιμών σε ζώα. π.χ, απ6 μελέτες τοξικότητας με εφάπαξ ή επανειλημμένη δερματική έκθεση, επειδή αυτά παρέχουν πληροφορίες που αφορούν άμεσα τις δερματικές επιδράσεις. Οι ουσίες που είναι γνωστά ερεθιστικά ή διαβρωτικά, όπως και εκείνες για τις οποίες υπάρχουν σαφείς αποδείξεις απουσίας διαβρωτικής ή ερεθιστικής ικανότητας, δεν χρειάζεται να υποβάλλονται σε δοκιμές *in vivo*.

Ανάλυση της σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR) (Στάδιο 2). Εάν υπάρχουν αποτελέσματα δοκιμών στις οποίες έχουν υποβληθεί ουσίες με παρεμφερή χημική δομή, θα πρέπει να εξετάζονται. Εφόσον τα διαθέσιμα δεδομένα για την επίδραση στον άνθρωπο ή/και στα ζώα ουσιών με παρεμφερή χημική δομή ή μιγμάτων τέτοιων ουσιών αρκούν για να καταδειχθεί η διαβρωτική/ερεθιστική για το δέρμα ικανότητα των τελευταίων, μπορεί να υποτεθεί ότι η ελεγχόμενη ουσία προκαλεί την ίδια απόκριση. Στις περιπτώσεις αυτές, η ελεγχόμενη ουσία δεν χρειάζεται να υποβληθεί σε δοκιμή. Τα αρνητικά δεδομένα από μελέτες ουσιών με παρεμφερή χημική δομή ή μιγμάτων τέτοιων ουσιών δεν αποτελούν, βάσει της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών, επαρκή απόδειξη της απουσίας διαβρωτικής/ερεθιστικής ικανότητας μιας ουσίας. Για τον προσδιορισμό τόσο της διαβρωτικής όσο και της ερεθιστικής ικανότητας στο δέρμα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται έγκυρες και αποδεκτές προσεγγίσεις SAR.

Φυσικοχημικές ιδιότητες και χημική δραστικότητα (Στάδιο 3). Οι ουσίες που εμφανίζουν ακραίες τιμές pH, όπως ≤ 2,0 κάι ≥ 11,5, είναι δυνατόν να έχουν ισχυρές τοπικές επιδράσεις. Εάν το ακραίο pH χρησιμοποιείται ως βάση για το χαρακτηρισμό μιας ουσίας ως διαβρωτικής για το δέρμα, τότε μπορεί να λαμβάνεται υπόψη η δεσμευμένη οξυτητα/αλκαλικότηια (ή ρυθμιστική ικανότητα) (ϊ)(4). Εάν η ρυθμιστική ικανότητα υποδεικνύει ότι η ουσία μπορεί να μην είναι διαβρωτικό του δέρματος, η ένδειξη αυτή θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με τη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών, κατά προτίμηση έγκυρων και αποδεκτών δοκιμων *in vitro* ή *ex vivo* (βλέπε στάδια 5 και 6),

Τοξικότητα μέσω του δέρματος (Στάδιο 4): Εάν μια χημική ουσία έχει αποδειχθεί πολύ τοξική από τη δερματική οδό, ενδέχεται να μην είναι πρακτικά εφικτό να διεξαχθεί μελέτη δερματικού ερεθισμού/διάβρωσης *in vivo*, επειδή η συνήθως εφαρμοζόμενη ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας μπορεί να υπερβαίνει την πολύ τοξική δόση, προκαλώντας το θάνατο ή μεγάλη ταλαιπωρία των ζώων. Επιπλέον, εάν έχουν ήδη διεξαχθεί μελέτες τοξικότητας μέσω του δέρματος σε αλφικά κουνέλια, με δόσεις που φθάνουν μέχρι το οριακό επίπεδο των 2 000 mg/kg βάρους σώματος ή και μεγαλύτερες, και δεν έχει διαπιστωθεί ερεθισμός ούτε διάβρωση του δέρματος, μπορεί να μην χρειάζονται πρόσθετες δοκιμές δερματικού ερεθισμού/διάβρωσης. Κατά την αξιολόγηση των δεδομένων οξείας τοξικότητας μέσω του δέρματος που έχουν προκύψει από παλαιότερες μελέτες, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη ορισμένες παράμετροι, όπως: τα στοιχεία για τις βλάβες του δέρματος που έχρυν αναφερθεί μπορεί να είναι ελλιπή- οι δοκιμές και οι παρατηρήσεις μπορεί να αφορούν άλλα είδη και όχι κουνέλια, ενώ υπάρχουν ενδεχομένως μεγάλες διαφορές μεταξύ των ειδών ως προς την ευαισθησία της απόκρισης- επίσης, η μορφή με την οποία χορηγήθηκε η ουσία στα ζώα μπορεί να μην είναι κατάλληλη για τη εκτίμηση του ερεθισμού ή της διάβρωσης του δέρματος (π.χ. αραίωση των ουσιών στις δοκιμές τοξικότητας μέσω του δέρματος (5). Στις περιπτώσεις, όμως, που σχεδιάσθηκαν και διεξάχθησαν άρτια μελέτες τοξικότητας μέσω του δέρματος σε κουνέλια, τα αρνητικά ευρήματα μπορούν να θεωρηθούν επαρκής απόδειξη του ότι μια ουσία δεν είναι διαβρωτική ή ερεθιστική.

Αποτελέσματα δοκιμών in vitro ή ex vivo (Στάδια 5 και 6). Οι ουσίες που έχουν εμφανίσει διαβρωτικές ή ισχυρές ερεθιστικές ιδιότητες σε έγκυρες και αποδεκτές δοκιμές *in vitro ή ex vivo* (6)(7), οι οποίες έχουν σχεδιασθεί για την αξιολόγηση των συγκεκριμένων επιδράσεων, δεν χρειάζεται να ελέγχονται με δοκιμές σε ζώα· τεκμαίρεται άτι οι εν λόγω ουσίες θα έχουν ανάλογες σοβαρές επιδράσεις και *in vivo*.

▼B

Δοκιμή in vivo σε κουνέλια (Στάδια 7 και 8). Εφόσον, με βάση ανάλυση βάρους της μαρτυρίας, αποφασιστεί να διεξαχθούν δοκιμές *in vivo*, το πρώτο βήμα πρέπει να είναι μια αρχική δοκιμή σε ένα ζώο. Εάν από τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής προκύψει ότι η ουσία είναι διαβρωτική για το δέρμα, δεν θα πρέπει να διεξαχθούν άλλες δοκιμές. Εάν κατά την αρχική δοκιμή δεν παρατηρηθεί διαβρωτική επίδραση, η ερεθιστική ή αρνητική απόκριση πρέπει να επιβεβαιωθεί με έκθεση δύο επιπλέον ζώων για χρονικό διάστημα τεσσάρων ωρών. Εάν κατά την αρχική δοκιμή έχει παρατηρηθεί ερεθιστική επίδραση, η επιβεβαιωτική δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί είτε με διαδοχική είτε με ταυτόχρονη έκθεση των δύο επιπλέον ζώων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Σουηδία, 22-24 January 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) ΟΟΣΑ (1998), Εναρμονισμένο Ολοκληρωμένο Σύστημα Ταξινόμησης Κινδύνων για τις Επιδράσεις των Χημικών Ουσιών στην Υγεία του ανθρώπου και στο Περιβάλλον, το οποίο εγκρίθηκε από την 28η κοινή συνεδρίαση της επιτροπής χημικών προϊόντων και της ομάδας εργασίας.για τα χημικά προϊόντα, το Νοέμβριο του 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2 (1) pp 19-26.

(5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411-436.

(6) Μέθοδος δοκιμών B .40.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483-524.

▼B

Διάγραμμα

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΓΙΑ ΕΡΕΘΙΣΜΟ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

	Activity	Finding	Conclusion
1	Existing human and/or animal data showing effects on skin or mucous membranes	Corrosive	Apical endpoint; considered corrosive. No testing is needed.
		Irritating	Apical endpoint; considered to be an irritant. No testing is needed.
		Not corrosive/not irritating	Apical endpoint; considered not corrosive or irritating. No testing required.
	↓ *No information available, or available information is not conclusive* ↓		
2	Perform SAR evaluation for skin corrosion/irritation	Predict severe damage to skin	Considered corrosive. No testing is needed.
		Predict irritation to skin	Considered an irritant. No testing is needed.
	↓ *No predictions can be made, or predictions are not conclusive or negative* ↓		
3	Measure pH (consider buffering capacity, if relevant)	pH ≤ 2 or ≥ 11.5 (with high buffering capacity, if relevant)	Assume corrosivity. No testing is needed.
	↓ *2 < pH < 11.5, or pH ≤ 2.0 or ≥ 11.5 with low/no buffering capacity, if relevant* ↓		
4	Evaluate systemic toxicity data via dermal route (1)	Very toxic	No further testing is needed.
		Not corrosive or irritating when tested to limit dose of 2000 mg/kg body weight or higher, using rabbits	Assume not corrosive or irritating. No further testing is needed.
	↓ *Such information is not available or is non-conclusive* ↓		
5	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin corrosion	Corrosive response	Assume corrosivity *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Substance is not corrosive* ↓		
6	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin irritation	Irritant response	Assume irritancy *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Validated in vitro or ex vivo testing methods for skin irritation are not yet available or substance is not an irritant* ↓		
7	Perform initial *in vivo* rabbit test using one animal	Severe damage to skin	Considered corrosive. No further testing is needed.
	↓ *No severe damage* ↓		
8	Perform confirmatory test using one or two additional animals	Corrosive or irritating	Considered corrosive or irritating. No further testing is needed
		Not corrosive or irritating	Considered not corrosive or irritating. No further testing needed

(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼B

B.5. **ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ**

1. **Η ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών TG 405 (2002) του ΟΟΣΑ.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την ανάπτυξη της παρούσας αναπροσαρμοσμένης μεθόδου, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στις δυνατότητες βελτίωσης με την αξιολόγηση όλων των διαθέσιμων στοιχείων σχετικά με τις ελεγχόμενες ουσίες, ώστε να μην διεξάγονται περιττές δοκιμές πειραματόζωα και, κατ' επέκταση να υπάρξει ανταπόκριση στον προβληματισμό για τη καλή μεταχείριση των ζώων. Η μέθοδος περιλαμβάνει τη σύσταση να υποβάλλονται τα υφιστάμενα δεδομένα σε ανάλυση βάρους της μαρτυρίας (1), πριν από την διεξαγωγή της περιγραφόμενης δοκιμής *in vivo* για οξείας μορφής διάβρωση/ερεθισμό των οφθαλμών. Εφόσον τα διαθέσιμα δεδομένα είναι ανεπαρκή, συνιστάται να συμπληρώνονται με την εφαρμογή ακολουθιακού ελέγχου (2) (3). Η συνιστώμενη στρατηγική δοκιμών περιλαμβάνει την εκτέλεση έγκυρων και αποδεκτών δοκιμασιών *in vitro* και παρατίθεται σε παράρτημα της μεθόδου δοκιμών. Επιπλέον, πριν εξεταστεί το ενδεχόμενο οφθαλμικής δοκιμής *in vivo*, συνιστάται την διεξαγωγή δοκιμής *in vivo* για διάβρωση/ερεθισμό του δέρματος με σκοπό την πρόγνωση της διάβρωσης των οφθαλμών.

Προς όφελος τόσο της ορθότητας του επιστημονικού έργου, όσο και της πρόνοιας για τα ζώα, δεν θα πρέπει να διεξάγονται δοκιμές *in vivo*, πριν αξιολογηθούν, με ανάλυση βάρους της μαρτυρίας, όλα τα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με την πιθανή διαβρωτική/ερεθιστική επίδραση των ουσιών στους οφθαλμούς. Τα εν λόγω δεδομένα περιλαμβάνουν στοιχεία από προηγούμενες μελέτες στον άνθρωπο ή/και σε πειραματόζωα, στοιχεία που αποδεικνύουν ότι μια ή περισσότερες ουσίες με ανάλογη χημική δομή ή μείγματα τέτοιων ουσιών προκαλούν διάβρωση/ερεθισμό, δεδομένα υψηλής οξύτητας ή αλκαλικότητας των ουσιών (4) (5) και αποτελέσματα έγκυρων και αποδεκτών δοκιμών *in vitro* ή *ex vivo* για διάβρωση και ερεθισμό του δέρματος (6) (6a). Οι μελέτες αυτές είναι δυνατόν να έχουν διεξαχθεί πριν από την ανάλυση βάρους της μαρτυρίας ή ως απόρροιά της.

Από την ανωτέρω ανάλυση ενδέχεται να προκύπτει ανάγκη μελετών *in vivo* της διαβρωτικής/ερεθιστικής για τους οφθαλμούς ικανότητας ορισμένων ουσιών. Στις περιπτώσεις αυτές, πριν εξεταστεί το ενδεχόμενο εφαρμογής της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo*, θα πρέπει πρώτα να μελετώνται και να αξιολογούνται οι δερματικές επιδράσεις των ουσιών *in vivo* σύμφωνα με την μέθοδο δοκιμών B.4 (7). Η εφαρμογή της ανάλυσης βάρους της μαρτυρίας, καθώς και της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών αναμένεται να περιορίσει την ανάγκη διεξαγωγής δοκιμών *in vivo* για διαβρωτική/ερεθιστική επίδραση στους οφθαλμούς, ουσιών για τις οποίες υπάρχουν ήδη επαρκή αποδεικτικά στοιχεία, προερχόμενα από άλλες μελέτες. Εάν η διαβρωτική/ερεθιστική για τους οφθαλμούς ικανότητα δεν είναι δυνατόν προσδιοριστεί με τη στρατηγική διαδοχικών δοκιμών, ακόμη και μετά τη μελέτη της διάβρωσης και του ερεθισμού του δέρματος *in vivo*, τότε μπορεί διεξάγεται δοκιμή *in vivo* για διάβρωση/ερεθισμό των οφθαλμών.

▼B

Σε παράρτημα της παρούσας μεθόδου παρατίθεται προτιμώμενη στρατηγική διαδοχικών δοκιμών (ακολουθιακός έλεγχος), που περιλαμβάνει τη διεξαγωγή έγκυρων και αποδεκτών δοκιμών διάβρωσης/ερεθισμού *in vitro* ή *ex vivo*. Η στρατηγική αυτή διαμορφώθηκε σε ημερίδα του ΟΟΣΑ, προτάθηκε ομόφωνα από τους συνέδρους (8) και εγκρίθηκε ως συνιστώμενη στρατηγική δοκιμών στο Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης Χημικών Ουσιών (Globaly Harmonised System for the Classification oh Chemical Substances/GHS (9). Συνιστάται η εφαρμογή της εν λόγω στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών *in vivo*. Προκειμένου για νέες ουσίες, αποτελεί τη συνιστώμενη κλιμακωτή προσέγγιση για τη συλλογή επιστημονικώς ορθών στοιχείων σχετικά με τη διαβρωτική/ερεθιστική δράση των ουσιών. Στην περίπτωση των υφισταμένων ουσιών, για τις οποίες δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία όσον αφορά τη δερματική και οφθαλμική διάβρωση/ερεθισμό, η στρατηγική θα πρέπει να χρησιμοποιείται για να συμπληρωθούν τα κενά στα δεδομένα. Η εφαρμογή διαφορετικής στρατηγικής ή διαδικασίας δοκιμών η τυχόν απόφαση να μην εφαρμοστεί κλιμακωτή προσέγγιση δοκιμών θα πρέπει να αιτιολογείται.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Ερεθισμός των οφθαλμών: είναι η πρόκληση αλλοιώσεων του οφθαλμού, οι οποίες εμφανίζονται μετά την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνειά του και είναι πλήρως αναστρέψιμες εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας.

Διάβρωση των οφθαλμών: είναι η βλάβη ιστών του οφθαλμού ή σοβαρή μείωση της όρασης, η οποία εμφανίζεται μετά την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού και δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη εντός 21 ημερών από την εφαρμογή της ουσίας.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Μία δόση της ελεγχόμενης ουσίας εφαρμόζεται εφάπαξ σε έναν από τους οφθαλμούς του πειραματοζώου, ενώ ο οφθαλμός που δεν έχει υποβληθεί σε αγωγή χρησιμεύει ως μάρτυρας. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, αξιολογείται η έκταση του ερεθισμού/της διάβρωσης του οφθαλμού με βαθμολόγηση τω αλλοιώσεων του επιπεφυκότα, του κερατοειδούς και της ίριδας. Περιγράφονται επίσης τυχόν άλλες επιδράσεις στους οφθαλμούς και συστημικές δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την πλήρη αξιολόγηση των επιδράσεων. Η διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να είναι επαρκής για να εκτιμηθεί αν οι επιδράσεις είναι αναστρέψιμες ή μη.

Τα ζώα που εμφανίζουν διαρκή σημεία έντονης δυσφορίας ή/και πόνου σε οποιοδήποτε στάδιο της δοκιμής θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία, οπότε η ουσία αξιολογείται ανάλογα. Κριτήρια για τη λήψη απόφασης σχετικά με την ευθανασία ετοιμοθάνατων ή βαρέως πασχόντων ζώων παρέχονται στη δημοσίευση (10).

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Προετοιμασία της δοκιμής *in vivo***

1.4.1.1 *Επιλογή είδους ζώων*

Το προτιμώμενο πειραματόζωο είναι το αλφικό κουνέλι και χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα. Η χρήση άλλων φυλών ή ειδών θα πρέπει να αιτιολογείται.

1.4.1.2 *Προετοιμασία των ζώων*

Κάθε πειραματόζωο που επιλέγεται προσωρινά για τη δοκιμή θα πρέπει, εντός των 24 ωρών που προηγούνται της έναρξης της, να υποβάλλεται σε οφθαλμολογική εξέταση και των δύο οφθαλμών. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα που εμφανίζουν ερεθισμένους οφθαλμούς, ανωμαλίες της όρασης ή προϋπάρχουσες κακώσεις του κερατοειδούς.

▼B

1.4.1.3 *Συνθήκες στέγασης και διατροφής*

Τα ζώα πρέπει να στεγάζονται χωριστά. Για τα κουνέλια, η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 20 °C (±3 °C). Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12ωρο. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

1.4.2 **Διαδικασία δοκιμής**

1.4.2.1 *Εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας*

Η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να τοποθετείται στο θόλο του επιπεφυκότα του ενός οφθαλμού κάθε ζώου, αφού τραβηχτεί, με απαλές κινήσεις, το κάτω βλέφαρο από το βολβό. Στη συνέχεια, με απαλές κινήσεις, τα βλέφαρα διατηρούνται κλειστά για ένα περίπου δευτερόλεπτο, για να αποφευχθεί η απώλεια υλικού. Ο άλλος οφθαλμός, που δεν υποβάλλεται σε αγωγή, χρησιμεύει ως μάρτυρας.

1.4.2.2 *Διαβροχή*

Οι οφθαλμοί των πειραματόζωων δεν πρέπει να εκπλύνονται για 24 ώρες τουλάχιστον μετά την ενστάλαξη της ελεγχόμενης ουσίας, εκτός εάν αυτή είναι στερεά (βλέπε παράγραφο 1.4.2.3.2), όπως και εάν εκδηλωθούν αμέσως διαβρωτικές ή ερεθιστικές επιδράσεις. Σε 24 ώρες μπορεί να γίνει έκπλυση, εάν θεωρηθεί απαραίτητο.

Δεν συνιστάται η χρήση δορυφορικής ομάδας ζώων για τη διερεύνηση της επίδρασης της έκπλυσης, εκτός εάν το επιβάλλουν επιστημονικοί λόγοι. Στις περιπτώσεις όπου απαιτείται δορυφορική ομάδα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δύο κουνέλια και να τεκμηριώνονται επιμελώς οι συνθήκες έκπλυσης, π.χ. χρόνος έκπλυσης, σύνθεση και θερμοκρασία του διαλύματος, διάρκεια, όγκος και ταχύτητα εφαρμογής.

1.4.2.3 *Επίπεδα δόσεων*

1.4.2.3.1 *Δοκιμή υγρών*

Για τη δοκιμή υγρών χρησιμοποιείται μία δόση 0,1 ml. Τα εκνεφώματα (σπρέι) δεν θα πρέπει να ενσταλάζονται απευθείας από τον ψεκαστήρα στον οφθαλμό. Το υγρό θα πρέπει να εκβάλλεται από τον περιέκτη, να συλλέγεται σε άλλο δοχείο και κατόπιν να λαμβάνονται 0,1 ml για ενστάλαξη στον οφθαλμό.

1.4.2.3.2 *Δοκιμή στερεών*

Για τη δοκιμή στερεών, αλοιφών και κοκκωδών υλικών, η χρησιμοποιούμενη ποσότητα πρέπει να έχει όγκο 0,1 ml ή βάρος που δεν υπερβαίνει τα 100 mg. Το ελεγχόμενο υλικό πρέπει να λειοτριβείται σε λεπτή σκόνη. Ο όγκος του στερεού υλικού πρέπει να μετράται μετά από ελαφρά συμπίεση, π.χ. με μικρά κτυπήματα στο δοχείο μέτρησης. Εάν η στερεά ελεγχόμενη ουσία δεν έχει απομακρυνθεί από τον οφθαλμό του πειραματόζωου, με τους φυσιολογικούς μηχανισμούς, κατά την πρώτο χρόνο παρατήρησης, που είναι μία ώρα μετά την αγωγή, ο οφθαλμός μπορεί να εκπλύνεται με φυσιολογικό ορό ή απεσταγμένο νερό.

▼B

1.4.2.3.3 *Δοκιμή αερολυμάτων*

Όλα τα εκνεφώματα και αερολύματα συνιστάται να συλλέγονται σε άλλο δοχείο πριν από την ενστάλαξή στον οφθαλμό, με μόνη εξαίρεση τις ουσίες που περιέχονται σε δοχεία υπό πίεση, οι οποίες δεν είναι δυνατόν να συλλεχθούν επειδή εξατμίζονται. Στις περιπτώσεις αυτές, ο οφθαλμός θα πρέπει να κρατείται ανοικτός και η ουσία να χορηγείται με ένα μόνο ψεκασμό διάρκειας ενός δευτερολέπτου περίπου από απόσταση 10 cm, ακριβώς απέναντι από τον οφθαλμό. Αυτή η απόσταση μπορεί να κυμαίνεται πράγμα που εξαρτάται από την πίεση του εκνεφώματος και από τα συστατικά του. Θα πρέπει να καταβάλλεται προσοχή ώστε ο οφθαλμός να μην υφίσταται βλάβη από την πίεση ψεκασμού. Σε ειδικές περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι αναγκαία η εκτίμηση της πιθανότητας να προκληθεί «μηχανική» βλάβη στον οφθαλμό από τη δύναμη του αερολύματος.

Η δόση του αερολύματος είναι δυνατόν να υπολογιστεί κατά προσέγγιση με την ακόλουθη προσομοίωση της δοκιμής: η ουσία ψεκάζεται μέσω οπής μεγέθους οφθαλμού κουνελιού επάνω σε χαρτί τοποθετημένο ακριβώς πίσω της. Η αύξηση του βάρους του χαρτιού παρέχει μια εκτίμηση της ποσότητας που θα ψεκαστεί στον οφθαλμό. Στην περίπτωση των πτητικών ουσιών, η δόση μπορεί να υπολογιστεί κατά προσέγγιση με ζύγιση του δοχείου που περιέχει το ελεγχόμενο υλικό πριν και μετά την αφαίρεσή του.

1.4.2.4 *Αρχική δοκιμή (Δοκιμή ερεθισμού/διάβρωσης των οφθαλμών* in vivo *σε ένα ζώο)*

Όπως αναφέρεται στη στρατηγική διαδοχικών δοκιμών (βλέπε παράρτημα 1), συνιστάται έντονα να διεξάγεται η δοκιμή *in vivo* πρώτα σε ένα μόνο ζώο.

Εάν τα αποτελέσματα της δοκιμής αυτής υποδεικνύουν, σύμφωνα με την περιγραφόμενη διαδικασία, ότι η ουσία είναι διαβρωτικό ή ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών, δεν θα πρέπει να διεξάγονται άλλες δοκιμές ερεθισμού των οφθαλμών.

1.4.2.5 *Τοπική αναισθησία*

Κατά περίπτωση, μπορούν να χρησιμοποιούνται τοπικά αναισθητικά. Εάν η ανάλυση βάρους της μαρτυρίας υποδεικνύει ότι η ουσία μπορεί να προκαλέσει πόνο ή εάν από την αρχική δοκιμή έχει προκύψει επώδυνη αντίδραση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί τοπικό αναισθητικό πριν από την ενστάλαξη της ελεγχόμενης ουσίας. Ο τύπος, η συγκέντρωση και η δόση του τοπικού αναισθητικού θα πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά, ώστε να εξασφαλίζεται ότι δεν πρόκειται να υπάρξει σημαντική διαφοροποίηση της αντίδρασης στην ελεγχόμενη ουσία λόγω της χρήσης του. Με τον ίδιο τρόπο θα πρέπει να αναισθητοποιείται και ο οφθαλμός μάρτυρας.

1.4.2.6 *Επιβεβαιωτική δοκιμή (δοκιμή ερεθισμού των οφθαλμών in vivo σε επιπλέον ζώα)*

Εάν δεν έχει παρατηρηθεί διαβρωτική επίδραση κατά την αρχική δοκιμή, η ερεθιστική ή αρνητική απόκριση θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με χρήση έως δύο επιπλέον ζώων. Εάν κατά την αρχική δοκιμή έχει παρατηρηθεί ισχυρή ερεθιστική επίδραση, που υποδεικνύει πιθανή σοβαρή (μη αναστρέψιμη) επίδραση κατά την επιβεβαιωτική δοκιμή, συνιστάται η διεξαγωγή της επιβεβαιωτικής δοκιμής σε διαδοχικές φάσεις με χρήση ενός ζώου κάθε φορά αντί της ταυτόχρονης έκθεσης των δύο επιπλέον ζώων. Εάν το δεύτερο ζώο εμφανίσει διαβρωτικές ή ισχυρές ερεθιστικές επιδράσεις, η δοκιμή διακόπτεται. Για την αξιολόγηση ασθενών ή μέτριων ερεθιστικών αποκρίσεων ενδέχεται να απαιτηθούν περισσότερα ζώα.

▼B

1.4.2.7 *Περίοδος παρατήρησης*

Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης θα πρέπει να είναι επαρκής για να εκτιμηθεί πλήρως η έκταση των παρατηρούμενων επιδράσεων και το κατά πόσον αυτές είναι αναστρέψιμες. Παρόλα αυτά, το πείραμα θα πρέπει να τερματίζεται αμέσως μόλις το ζώο εμφανίσει διαρκή σημεία ισχυρού πόνου ή δυσφορίας (9). Για να κριθεί αν οι επιδράσεις είναι αναστρέψιμες, τα ζώα θα πρέπει κατά κανόνα να παρατηρούνται για χρονικό διάστημα 21 ημερών μετά τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας. Εάν διαπιστωθεί ότι είναι αναστρέψιμες πριν παρέλθουν 21 ημέρες, το πείραμα θα πρέπει να τερματίζεται τη συγκεκριμένη αυτή στιγμή.

1.4.2.7.1 *Κλινικές παρατηρήσεις και διαβάθμιση των οφθαλμικών αντιδράσεων*

Οι οφθαλμοί θα πρέπει να εξετάζονται 1, 24, 48 και 72 ώρες μετά την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας. Τα ζώα θα πρέπει να παραμένουν στη δοκιμή μόνο για όσο χρόνο απαιτείται για να ληφθούν οριστικά στοιχεία. Τα ζώα που εμφανίζουν διαρκή σημεία ισχυρού πόνου ή δυσφορίας θα πρέπει να θανατώνονται αμέσως με ευθανασία, οπότε η ουσία αξιολογείται ανάλογα. Θα πρέπει επίσης να θανατώνονται με ευθανασία τα ζώα που εμφανίζουν τις ακόλουθες αλλοιώσεις μετά την ενστάλαξη, επειδή συνήθως αυτές δεν είναι αναστρέψιμες: διάτρηση ή σοβαρή εξέλκωση του κερατοειδούς, συμπεριλαμβανομένου του σταφυλώματος, αιμορραγία στον οπίσθιο θάλαμο του οφθαλμού, θολερότητα του κερατοειδούς βαθμού 4 για 48 ώρες; απουσία φωτοκινητικού αντανακλαστικού (βαθμός απόκρισης ίριδας 2) για 72 ώρες; εξέλκωση του επιπεφυκότα, νέκρωση του επιπεφυκότα ή της σκαρδαμυκτικής μεμβράνης, εσχάρα.

Τα ζώα που δεν εμφανίζουν αλλοιώσεις των οφθαλμών μπορούν να απομακρύνονται από τη δοκιμή, το νωρίτερο 3 ημέρες μετά την ενστάλαξη. Τα ζώα που εμφανίζουν ελαφρές έως μέτριες αλλοιώσεις θα πρέπει να παρατηρούνται μέχρι αυτές να εξαλειφθούν ή για χρονικό διάστημα 21 ημερών, οπότε η μελέτη τερματίζεται. Θα πρέπει να γίνεται παρατήρηση την 7η, 14η και 21η ημέρα για να παρακολουθείται η εξέλιξη των αλλοιώσεων και να κρίνεται αν αυτές είναι αναστρέψιμες ή μη.

Σε κάθε εξέταση θα πρέπει να καταγράφεται η βαθμολογία των οφθαλμικών αντιδράσεων (πίνακας Ι). Θα πρέπει επίσης να αναφέρονται τυχόν άλλες αλλοιώσεις του οφθαλμού (π.χ. πόνος, χρώση) ή συστημικές δυσμενείς επιδράσεις.

Η εξέταση των αντιδράσεων μπορεί να διευκολυνθεί με τη χρήση διόφθαλμου οφθαλμοσκοπίου, φορητής σχισμοειδούς λυχνίας, βιομικροσκοπίου ή άλλου κατάλληλου οργάνου. Μετά την καταγραφή των παρατηρήσεων του πρώτου 24ώρου, οι οφθαλμοί μπορούν να εξετάζονται περαιτέρω με τη βοήθεια φλουορεσκεΐνης.

Η διαβάθμιση των οφθαλμικών αποκρίσεων είναι κατ' ανάγκη υποκειμενική. Για να διευκολυνθεί η εναρμόνιση της διαβάθμισης των οφθαλμικών αποκρίσεων και να βοηθηθούν, αφενός τα εργαστήρια δοκιμών και, αφετέρου, το προσωπικό που εκτελεί και ερμηνεύει τις παρατηρήσεις, απαιτείται κατάλληλη εκπαίδευση του εν λόγω προσωπικού στο χρησιμοποιούμενο σύστημα βαθμολόγησης.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η βαθμολογία του οφθαλμικού ερεθισμού θα πρέπει να αξιολογείται σε συνδυασμό με το είδος και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων, καθώς και με το κατά πόσον αυτές είναι αναστρέψιμες. Οι επιμέρους βαθμοί δεν αντιπροσωπεύουν ένα απόλυτο πρότυπο για τις ερεθιστικές ιδιότητες ενός υλικού, δεδομένου ότι αξιολογούνται και άλλες επιδράσεις των ελεγχόμενων ουσιών. Αντίθετα, θα πρέπει να θεωρούνται ως τιμές αναφοράς και έχουν αξία μόνον εφόσον τεκμηριώνονται από πλήρη περιγραφή και αξιολόγηση όλων των παρατηρήσεων.

▼B

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1 ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Αιτιολόγηση της διεξαγωγής δοκιμής *in vivo:* ανάλυση βάρους της μαρτυρίας των δεδομένων που προϋπήρχαν, συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών:

— περιγραφή των σχετικών δεδομένων που έχουν προκύψει από προηγούμενες δοκιμές·

— δεδομένα που προέκυψαν σε κάθε στάδιο της στρατηγικής δοκιμών·

— περιγραφή των δοκιμών in vitro που πραγματοποιήθηκαν, με λεπτομέρειες για τις διαδικασίες και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τις ουσίες ελέγχου/αναφοράς·

— περιγραφή της μελέτης του δερματικού ερεθισμού/διάβρωσης in *vivo* που πραγματοποιήθηκε, καθώς και των αποτελεσμάτων της·

— ανάλυση βάρους της μαρτυρίας προκειμένου να διεξαχθεί μελέτη *in vivo.*

Ελεγχόμενη ουσία:

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS, πηγή, καθαρότητα, γνωστές ξένες προσμίξεις, αριθμός παρτίδας)·

— σύσταση και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. pH, πτητικότητα, διαλυτότητα, σταθερότητα, αντίδραση με το νερό)·

— προκειμένου για μίγματα, σύνθεση και εκατοστιαία αναλογία των συστατικών·

— εάν χρησιμοποιήθηκε τοπικό αναισθητικό, στοιχεία ταυτότητας, καθαρότητα, τύπος, δόση και πιθανή αλληλεπίδραση με την ελεγχόμενη ουσία.

Φορέας:

— στοιχεία ταυτότητας, συγκέντρωση (κατά περίπτωση), όγκος που χρησιμοποιήθηκε·

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Πειραματόζωα δοκιμής:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε, αιτιολόγηση της χρήσης άλλων ζώων αντί αλφικών κουνελιών·

— ηλικία κάθε ζώου κατά την έναρξη της μελέτης·

— αριθμός ζώων κάθε φύλου στις ομάδες δοκιμής και μαρτύρων (εφόσον απαιτούνται)·

— βάρος κάθε ζώου στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής·

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ..

Αποτελέσματα:

— περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμολόγηση του ερεθισμού σε κάθε χρονική στιγμή παρατήρησης (π.χ. φορητή σχισμοειδής λυχνία, βιομικροσκόπιο, φλουορεσκεΐνη)·

▼B

— καταχώρηση σε πίνακα των δεδομένων που αφορούν την ερεθιστική/διαβρωτική απόκριση για κάθε ζώο σε κάθε χρονική στιγμή παρατήρησης μέχρι την απομάκρυνσή του από τη δοκιμή·

— αναλυτική περιγραφή του είδους και της έκτασης του ερεθισμού ή της διάβρωσης που παρατηρήθηκε·

— περιγραφή άλλων αλλοιώσεων που ενδεχομένως παρατηρήθηκαν στον οφθαλμό (π.χ. νεοαγγείωση, σχηματισμός πάννου, συγκολλήσεις, χρώση)·

— περιγραφή άλλων δυσμενών τοπικών επιδράσεων εκτός της περιοχής των οφθαλμών και συστημικών επιδράσεων, καθώς και τυχόν παθολογοανατομικών ευρημάτων.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

3.2 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η παρέκταση στον άνθρωπο των αποτελεσμάτων μελετών ερεθισμού των οφθαλμών που έχουν διεξαχθεί σε πειραματόζωα ισχύει μόνον ως ένα σημείο. Σε πολλές περιπτώσεις το αλφικό κουνέλι είναι πιο ευαίσθητο από τον άνθρωπο στα ερεθιστικά ή διαβρωτικά των οφθαλμών.

Κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα πρέπει να καταβάλλεται προσοχή για να μην λαμβάνεται υπόψη ο ερεθισμός που οφείλεται σε δευτεροπαθείς μολύνσεις.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.

(2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C, Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159-164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19-26.

(5) Neun, DJ. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in Vitro* 12, pp.483-524.

(6a) Μέθοδο! δοκιμών Β.40. Διάβρωση του δέρματος,

(7) Μέθοδος δοκιμών Β.4. Οξεία τοξικότητα: ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

(8) ΟΟΣΑ (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OE.CD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Solna, Σουηδία, 22-24 Ιανουαρίου 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼B

(9) ΟΟΣΑ (1998) Εναρμονισμένο Ολοκληρωμένο Σύστημα Ταξινόμησης Κινδύνων για τις Επιδράσεις των Χημικών Ουσιών στην Υγεία του ανθρώπου και στο Περιβάλλον, το οποίο εγκρίθηκε από την 28η κοινή συνεδρίαση της επιτροπής χημικών προϊόντων και της ομάδας εργασίας για τα χημικά προϊόντα, το Νοέμβριο του 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

Πίνακας Ι

ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ

Κερατοειδής

Αδιαφάνεια: βαθμός θολερότητας (η ανάγνωση θα πρέπει να λαμβάνεται από την πιο θολή περιοχή) (*)

Καμία εξέλκωση ούτε αδιαφάνεια	0
Διάσπαρτες ή διάχυτες αδιαφανείς περιοχές (εκτός από ελαφρό θάμπωμα της φυσιολογικής στιλπνότητας), σαφώς διακρινόμενες λεπτομέρειες της ίριδας	1
Ευδιάκριτη ημιδιαφανής περιοχή, ελαφρά συγκάλυψη των λεπτομερειών της ίριδας	2
Γκρίζα περιοχή, πλήρης συγκάλυψη των λεπτομερειών της ίριδας: μόλις διακρινόμενο μέγεθος της κόρης	3
Αδιαφανής κερατοειδής; μη διακρινόμενη ίριδα	4

Μέγιστος δυνατός βαθμός: 4

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

(*) Θα πρέπει να σημειώνεται η επιφάνεια της αδιαφανούς περιοχής

Ίριδα

Φυσιολογική	0
Εμφανής βάθυνση των πτυχώσεων, συμφόρηση, οίδημα, μέτρια υπεραιμία από τους περιβάλλοντας τον κερατοειδή ιστούς, ή διαστολή, φωτοευαίσθητη ίριδα (η καθυστέρηση αντίδρασης θεωρείται θετικό εύρημα)	1
Αιμορραγία, μακροσκοπικώς ορατή καταστροφή ή καμία αντίδραση στο φως	2

Μέγιστος δυνατός βαθμός: 2

Επιπεφυκός

Φυσιολογική ερυθρότητα (αναφέρεται στο βλεφαρικό και βολβικό επιπεφυκότα, εκτός της ίριδας και του κερατοειδούς)

	0
Υπεραιμία ορισμένων αιμοφόρων αγγείων (Διαστολή)	1
Διάχυτο πορφυρό χρώμα, δυσδιάκριτα τα αιμοφόρα αγγεία	2
Διάχυτο ερυθρό χρώμα βοείου κρέατος	3

Μέγιστος δυνατός βαθμός: 3

Χήμωση

Οίδημα (αναφέρεται στα βλέφαρα ή/και στη σκαρδαμυκτική μεμβράνη)

Φυσιολογική	0
Οίδημα ελαφρώς μεγαλύτερο του φυσιολογικού	1
Εμφανές οίδημα με μερική αναστροφή των βλεφάρων	2
Οίδημα με τα βλέφαρα σχεδόν ημίκλειστα	3
Οίδημα με τα βλέφαρα σχεδόν κλειστά	4

Μέγιστος δυνατός βαθμός: 4

▼B

Παραρτημα

Στρατηγική διαδοχικών δοκιμών (ακολουθιακός έλεγχος) για ερεθισμό και διάβρωση των οφθαλμών

ΓΕΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ

Προς όφελος τόσο της ορθότητας του επιστημονικού έργου, όσο και της πρόνοιας για τα ζώα, έχει μεγάλη σημασία να αποφεύγεται η περιττή χρήση πειραματόζωων και να ελαχιστοποιείται η διεξαγωγή δοκιμών που είναι πιθανόν να τους προκαλέσουν ισχυρές αντιδράσεις. Πριν αντιμετωπιστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμών in *vivo,* θα πρέπει να αξιολογούνται όλα τα στοιχεία που αφορούν τις πιθανές διαβρωτικές/ερεθιστικές επιδράσεις των ουσιών στους οφθαλμούς. Ενδέχεται να υπάρχουν ήδη μαρτυρίες που αρκούν για τη ταξινόμηση της ελεγχόμενης ουσίας από πλευράς διαβρωτικής ή ερεθιστικής για τους οφθαλμούς ικανότητας, χωρίς να χρειάζονται δοκιμές σε πειραματόζωα. Η εφαρμογή επομένως της ανάλυσης βάρους της μαρτυρίας και μιας στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών ελαχιστοποιεί την ανάγκη διεξαγωγής δοκιμών *in vivo,* ιδίως εάν πιθανολογείται ότι η ουσία προκαλεί ισχυρές αντιδράσεις.

Συνιστάται η χρήση της ανάλυσης βάρους της μαρτυρίας για την αξιολόγηση των διαθέσιμων στοιχείων σχετικά με τη διάβρωση και τον ερεθισμό των οφθαλμών από την εκάστοτε ουσία, προκειμένου να κριθεί αν πρέπει να διεξαχθούν συμπληρωματικές μελέτες, πλην οφθαλμικών μελετών *in vivo,* για να βοηθήσουν στο χαρακτηρισμό των συγκεκριμένων ιδιοτήτων. Εφόσον χρειάζονται περαιτέρω μελέτες, συνιστάται η εφαρμογή της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών για τη συλλογή των σχετικών πειραματικών δεδομένων. Στην περίπτωση των ουσιών που δεν έχουν υποβληθεί σε δοκιμές στο παρελθόν, η στρατηγική διαδοχικών δοκιμών θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συλλογή των δεδομένων που απαιτεί η αξιολόγηση της διαβρωτικής/ερεθιστικής για τους οφθαλμούς ικανότητας των ουσιών. Η στρατηγική δοκιμών που περιγράφεται στο παρόν παράρτημα διαμορφώθηκε σε ημερίδα του ΟΟΣΑ (1) και, στη συνέχεια, επικυρώθηκε και διευρύνθηκε στο Εναρμονισμένο. Ολοκληρωμένο Σύστημα Ταξινόμησης Κινδύνων για τις Επιδράσεις των Χημικών Ουσιών στην Υγεία του ανθρώπου και στο Περιβάλλον, το οποίο εγκρίθηκε από την 28η κοινή συνεδρίαση της επιτροπής χημικών προϊόντων και της ομάδας εργασίας για τα χημικά προϊόντα, το Νοέμβριο του 1998 (2).

Η παρούσα στρατηγική δοκιμών δεν αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της μεθόδου δοκιμών Β.5, αλλά έκφραση της συνιστώμενης προσέγγισης για τον προσδιορισμό των ερεθιστικών/διαβρωτικών για τους οφθαλμούς ιδιοτήτων. Η προσέγγιση αυτή αντιπροσωπεύει, αφενός την ορθή πρακτική και, αφετέρου, ένα δεοντολογικό σημείο αναφοράς για τη διεξαγωγή δοκιμών οφθαλμικής διάβρωσης/ερεθισμού *in vivo.* Η μεθοδολογία δοκιμών παρέχει κατευθύνσεις για τη διεξαγωγή της δοκιμής *in vivo* και συγκεφαλαιώνει τους παράγοντες που θα πρέπει να εξετάζονται πριν αποφασιστεί μια τέτοια δοκιμή. Η στρατηγική διαδοχικών δοκιμών παρέχει μια προσέγγιση βασισμένη στην ανάλυση βάρους της μαρτυρίας για την αξιολόγηση των διαθέσιμων δεδομένων σχετικά με τις ερεθιστικές/διαβρωτικές για τους οφθαλμούς ιδιότητες των ουσιών, καθώς και μια κλιμακωτή προσέγγιση για τη παραγωγή των σχετικών δεδομένων στην περίπτωση των ουσιών για τις οποίες χρειάζονται συμπληρωματικές δοκιμές ή δεν έχουν διεξαχθεί δοκιμές. Η εν λόγω στρατηγική περιλαμβάνει τη διεξαγωγή, σε συγκεκριμένες περιστάσεις, πρώτα έγκυρων και αποδεκτών δοκιμών *in vitro* ή *ex vivo* και, κατόπιν, μελετών με τη μέθοδο δοκιμών Β.4 για διάβρωση/ερεθισμό του δέρματος. (3)(4).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΚΛΙΜΑΚΩΤΗΣ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗΣ ΔΟΚΙΜΩΝ

Πριν από τη. διεξαγωγή δοκιμών στο πλαίσιο της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών (βλέπε διάγραμμα), θα πρέπει να αξιολογούνται όλα τα διαθέσιμα στοιχεία, προκειμένου να κριθεί αν είναι αναγκαίο να διεξαχθούν οφθαλμικές δοκιμές *in vivo.* Αν και είναι δυνατόν να προκύψουν σημαντικά στοιχεία από την αξιολόγηση μεμονωμένων παραμέτρων (π.χ. ακραίες τιμές pH), θα πρέπει παρόλα αυτά να εξετάζεται το σύνολο των υφισταμένων στοιχείων. Προκειμένου να ληφθεί απόφαση με βάση ανάλυση βάρους της μαρτυρίας, θα πρέπει να αξιολογούνται όλα τα σημαντικά δεδομένα που αφορούν τις επιδράσεις της εκάστοτε ουσίας ή των αναλόγων της, και η απόφαση αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται. Θα πρέπει να δίδεται έμφαση πρωτίστως στα διαθέσιμα δεδομένα για τις επιδράσεις των ουσιών στον άνθρωπο και στα ζώα και, κατόπιν, στα αποτελέσματα δοκιμών *in vitro* ή *ex vivo.* Θα πρέπει να αποφεύγονται, στο μέτρο του δυνατού, οι μελέτες διαβρωτικών ουσιών *in vivo.* Οι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη στη στρατηγική δοκιμών περιλαμβάνουν:

▼B

Αξιολόγηση υφιστάμενων δεδομένων για τον άνθρωπο και τα ζώα (Στάδιο 1). Πρώτα θα πρέπει να εξετάζονται τα διαθέσιμα δεδομένα που αφορούν τον άνθρωπο, π.χ. από κλινικές μελέτες ή μελέτες επαγγελματικής έκθεσης και αναφορές περιστατικών, ή/και τα δεδομένα δοκιμών σε ζώα από οφθαλμικές μελέτες, επειδή αυτά παρέχουν πληροφορίες που αφορούν άμεσα τις επιδράσεις στους οφθαλμούς. Στη συνέχεια, θα πρέπει να αξιολογούνται τα διαθέσιμα δεδομένα από μελέτες στον άνθρωπο ή/και στα ζώα με αντικείμενο τη διερεύνηση του ερεθισμού/της διάβρωσης του δέρματος. Οι ουσίες που είναι γνωστά διαβρωτικά ή ισχυρά ερεθιστικά των οφθαλμών δεν θα πρέπει να ενσταλάζονται στους οφθαλμούς πειραματόζωων. Το ίδιο ισχύει για τις ουσίες που έχουν διαβρωτικές ή ερεθιστικές επιδράσεις στο δέρμα. Οι εν λόγω ουσίες θα πρέπει να θεωρούνται διαβρωτικές ή/και ερεθιστικές και για τους οφθαλμούς. Οι ουσίες για τις οποίες υπάρχουν σαφείς αποδείξεις απουσίας διαβρωτικής ή ερεθιστικής ικανότητας, προερχόμενες από παλαιότερες οφθαλμικές μελέτες, δεν θα πρέπει επίσης να υποβάλλονται σε οφθαλμικές δοκιμές *in vivo*.

Ανάλυση της σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR) (Στάδιο 2). Εάν υπάρχουν αποτελέσματα δοκιμών σης οποίες έχουν υποβληθεί ουσίες με παρεμφερή χημική δομή, θα πρέπει να εξετάζονται. Εφόσον τα διαθέσιμα δεδομένα για την επίδραση στον άνθρωπο ή/και στα ζώα ουσιών με παρεμφερή χημική δομή ή μιγμάτων τέτοιων ουσιών αρκούν για να καταδειχθεί η διαβρωτική/ερεθιστική για τους οφθαλμούς ικανότητα των τελευταίων, είναι δυνατόν να υποτεθεί ότι η ελεγχόμενη ουσία προκαλεί την ίδια απόκριση. Στις περιπτώσεις αυτές, η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να μην χρειάζεται να υποβληθεί σε δοκιμή. Τα αρνητικά δεδομένα από μελέτες ουσιών με παρεμφερή χημική δομή ή μιγμάτων τέτοιων ουσιών δεν αποτελούν, βάσει της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών, επαρκή απόδειξη της απουσίας διαβρωτικής/ερεθιστικής ικανότητας μιας ουσίας. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται έγκυρες και αποδεκτές προσεγγίσεις SAR για τον προσδιορισμό της διαβρωτικής και της ερεθιστικής ικανότητας τόσο ως προς το δέρμα, όσο και ως προς τους οφθαλμούς.

Φυσικοχημικές ιδιότητες και χημική δραστικότητα (Στάδιο 3). Οι ουσίες που εμφανίζουν ακραίες τιμές pH, όπως $\leq$ 2,0 και $\geq$ 11,5, είναι δυνατόν να έχουν ισχυρές τοπικές επιδράσεις. Εάν το ακραίο pH χρησιμοποιείται ως βάση για το χαρακτηρισμό μιας ουσίας ως διαβρωτικής ή ερεθιστικής για τους οφθαλμούς, τότε μπορεί να λαμβάνεται υπόψη και η δεσμευμένη οξύτητα/αλκαλικότητα (ή ρυθμιστική ικανότητα) (5) (6). Εάν η ρυθμιστική χωρητικότητα υποδεικνύει ότι η ουσία μπορεί να μην είναι διαβρωτικό των οφθαλμών, η ένδειξη αυτή θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με τη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών, κατά προτίμηση έγκυρων και αποδεκτών δοκιμών *in vitro* ή *ex vivo* (βλέπε στάδια 5 και 6).

Μελέτη άλλων διαθέσιμων στοιχείων (Στάδιο 4). Στο στάδιο αυτό θα πρέπει να αξιολογούνται όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τη συστημική τοξικότητα από τη δερματική οδό. Θα πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη η μέσω του δέρματος οξεία τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας. Εάν η ελεγχόμενη ουσία έχει αποδειχθεί πολύ τοξική από τη δερματική οδό, μπορεί να μην χρειάζεται να υποβληθεί σε οφθαλμικές δοκιμές. Παρόλο που η οξεία τοξικότητα μέσω του δέρματος δεν σχετίζεται κατ' ανάγκη με τη διάβρωση/τον ερεθισμό των οφθαλμών, είναι δυνατόν να υποτεθεί ότι ένας παράγοντας υψηλής τοξικότητας από τη δερματική οδό θα έχει πολύ τοξική δράση και όταν ενσταλαχθεί στους οφθαλμούς. Η μελέτη των δεδομένων αυτών μπορεί επίσης να παρεμβληθεί μεταξύ των σταδίων 2 και 3.

Αποτελέσματα δοκιμών in vitro ή ex vivo (Στάδια 5 και 6). Οι ουσίες που έχουν εμφανίσει διαβρωτικές ή ισχυρές ερεθιστικές ιδιότητες σε δοκιμές *in vitro* ή *ex vivo* (7) (8), οι οποίες έχουν επικυρωθεί και είναι αποδεκτές για την αξιολόγηση των διαβρωτικών/ερεθιστικών επιδράσεων στους οφθαλμούς ή στο δέρμα, δεν χρειάζεται να ελέγχονται με δοκιμές σε ζώα τεκμαίρεται ότι οι εν λόγω ουσίες θα έχουν ανάλογες σοβαρές επιδράσεις και *in vivo*. Εάν δεν υπάρχουν έγκυρες και αποδεκτές δοκιμές *in vitro/ex vivo,* τα στάδια 5 και 6 παρακάμπτονται και εφαρμόζεται κατευθείαν το στάδιο 7.

Αξιολόγηση της ερεθιστικής ή διαβρωτικής για το δέρμα ικανότητας των ουσιών in vivo (Στάδιο 7). Εφόσον τα διαθέσιμα στοιχεία δεν αρκούν για να διενεργηθεί αδιαμφισβήτητη ανάλυση βάρους της μαρτυρίας των δεδομένων από τις προαναφερόμενες μελέτες ως προς την πιθανή ερεθιστική/διαβρωτική επίδραση μιας ουσίας στους οφθαλμούς, θα πρέπει πρώτα να αξιολογείται η ερεθιστική/διαβρωτική για το δέρμα ικανότητα *in vivo* με εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών B.4 (4) και του παρατήματός της (9). Εάν διαπιστωθεί ότι η ουσία προκαλεί διάβρωση ή σοβαρό ερεθισμό του δέρματος, θα πρέπει να θεωρείται διαβρωτική ή ερεθιστική και για τους οφθαλμούς, εκτός εάν άλλα στοιχεία δικαιολογούν διαφορετικό συμπέρασμα. Κατά συνέπεια, δεν χρειάζεται δοκιμή *in vivo* στους οφθαλμούς. Εάν η ουσία δεν είναι διαβρωτικό ούτε ισχυρό ερεθιστικό του δέρματος, θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμή *in vivo* στους οφθαλμούς.

▼B

Δοκιμή in vivo σε κουνέλια (Στάδια 8 και 9): Το πρώτο βήμα της οφθαλμικής μελέτης *in vivo* θα πρέπει να είναι μια αρχική δοκιμή σε ένα ζώο. Εάν από τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής προκύπτει ότι η ουσία είναι ισχυρό ερεθιστικό ή διαβρωτικό των οφθαλμών, δεν θα πρέπει να διεξάγονται άλλες δοκιμές. Εάν κατά την αρχική δοκιμή δεν διαπιστωθούν διαβρωτικές ή ισχυρές ερεθιστικές επιδράσεις, διεξάγεται επιβεβαιωτική δοκιμή σε δύο επιπλέον ζώα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) ΟΟΣΑ (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Solna, Σουηδία, 22-24 Ιανουαρίου 1996 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) ΟΟΣΑ (1998). Εναρμονισμένο Ολοκληρωμένο Σύστημα Ταξινόμησης Κινδύνων για τις Επιδράσεις των Χημικών Ουσιών στην Υγεία του ανθρώπου και στο Περιβάλλον, το οποίο εγκρίθηκε από την 28η κοινή συνεδρίαση της επιτροπής χημικών προϊόντων και της ομάδας εργασίας για τα χημικά προϊόντα, το Νοέμβριο του 1998 (http://wwwl .oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

(4) Μέθοδος δοκιμών Β.4. Οξεία τοξικότητα: ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro, 2,* 19-26.

(6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham,. P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483-524.

(8) Μέθοδος δοκιμών Β.40 Διάβρωση του δέρματος.

(9) Παράρτημα της μεθόδου δοκιμών Β.4: Στρατηγική διαδοχικών δοκιμών (ακολουθιακός έλεγχος) για ερεθισμό και διάβρωση του δέρματος.

▼B

Διάγραμμα

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΓΙΑ ΕΡΕΘΙΣΜΟ/ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

	Δραστηριότητα	Ευρήματα	Γνωμάτευση
1	Ύπαρξη δεδομένων για τον άνθρωπο ή/και τα ζώα, τα οποία δείχνουν επιδράσεις στους οφθαλμούς.	Σοβαρή βλάβη των οφθαλμών	Κορυφαίο τελικό σημείο· η ουσία χαρακτηρίζεται διαβρωτικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
		ερεθιστικό των οφθαλμών	Κορυφαίο τελικό σημείο· η ουσία χαρακτηρίζεται ερεθιστικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
		μη διαβρωτικό μη ερεθιστικό των οφθαλμών	Κορυφαίο τελικό σημείο· η ουσία χαρακτηρίζεται μη διαβρωτικό και μη ερεθιστικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	Ύπαρξη δεδομένων για τον άνθρωπο ή/και τα ζώα, τα οποία δείχνουν διαβρωτικές επιδράσεις στο δέρμα	Διαβρωτικό του δέρματος	Κατά τεκμήριο, διαβρωτικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	Ύπαρξη δεδομένων για τον άνθρωπο ή/και τα ζώα, τα οποία δείχνουν ερεθιστικές επιδράσεις στο δέρμα	Σοβαρός ερεθιστικό του δέρματος	Κατά τεκμήριο, ερεθιστικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	↓		
	Δεν υπάρχουν στοιχεία ή τα διαθέσιμα στοιχεία δεν είναι αδιαμβισβήτητα		
	↓		
2	Αξιολόγηση της σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR) για διάβρωση/ερεθισμό των οφθαλμών	Πρόγνωση σοβαρής βλάβης των οφθαλμών	Κατά τεκμήριο, διαβρωτικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
		Πρόγνωση ερεθισμού των οφθαλμών	Κατά τεκμήριο, ερεθιστικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	Αξιολόγηση SAR για διάβρωση του δέρματος	Πρόγνωση διάβρωσης του δέρματος	Κατά τεκμήριο, διαβρωτικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	↓		
	Δεν είναι δυνατόν να γίνει πρόγνωση ή η πρόγνωση είναι αβέβαιη ή αρνητική		
	↓		
3	Μέτρηση του pH (συνεκτίμηση της ρυθμιστικής ικανότητας, εάν απαιτείται)	pH ≤ 2 ή ≥ 11,5 (με μεγάλη ρυθμιστική χωρητικότητα, εάν έχει σημασία)	Κατά τεκμήριο, διαβρωτικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	↓		
	2 < pH < 11,5 ή pH ≤ 2,0 ή ≥ 11,5 με μικρή/μηδενική ρυθμιστική. ικανότητας, εάν απαιτείται		
	↓		
4	Αξιολόγηση δεδομένων συστημικής τοξικότητας από τη δερματική οδό	Υψηλή τοξικότητα στις συγκεντρώσεις που θα ελέγχονταν στους οφθαλμούς.	Η ουσία είναι υπερβολικά τοξική για τη διεξαγωγή δοκιμών. Δεν χρειάζονται δοκιμές.
	↓		
	Δεν υπάρχουν στοιχεία ή η ουσία δεν είναι πολύ τοξική		
	↓		

▼B

5	Διεξαγωγή έγκυρης και αποδεκτής δοκιμής *in vitro* ή *ex vivo* για διάβρωση των οφθαλμών	Διάβρωση	Κατά τεκμήριο, διαβρωτικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές.
	↓		
	Η ουσία δεν είναι διαβρωτική ή δεν υπάρχουν έγκυρης μέθοδοι δοκιμών in vitro *ή* ex vivo *για διάβρωση των οφθαλμών*		
	↓		
6	Διεξαγωγή έγκυρης και αποδεκτής δοκιμής *in vitro* ή *ex vivo* για ερεθισμό των οφθαλμών	Ερεθισμός	Κατά τεκμήριο, ερεθιστικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές.
	↓		
	Η ουσία δεν είναι ερεθιστική ή δεν υπάρχουν έγκυρης μέθοδοι δοκιμών in vitro *ή* ex vivo *για ερεθισμό των οφθαλμών.*		
	↓		
7	Πειραματική εκτίμηση *in vivo* της ερεθιστικής/διαβρωτικής για το δέρμα ικανότητας (βλ. μέθοδο δοκιμών Β.4 και το παράρτημά της)	Διάβρωση ή σοβαρός ερεθισμός	Κατά τεκμήριο, διαβρωτικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές.
	↓		
	Η ουσία δεν είναι διαβρωτική ούτε πολύ ερεθιστική για το δέρμα		
	↓		
8	Διεξαγωγή αρχικής οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια με χρήση μόνον ενός ζώου	Σοβαρή βλάβη των οφθαλμών	Η ουσία χαρακτηρίζεται διαβρωτικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές.
	↓		
	Καμία σοβαρή βλάβη ή καμία απόκριση		
	↓		
9	Διεξαγωγή επιβεβαιωτικής δοκιμής σε ένα ή δύο επιπλέον ζώα	Διάβρωση ή ερεθισμός	Η ουσία χαρακτηρίζεται διαβρωτικό ή ερεθιστικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές
		Ούτε διάβρωση ούτε ερεθισμός	Η ουσία χαρακτηρίζεται μη διαβρωτικό και μη ερεθιστικό των οφθαλμών. Δεν χρειάζονται άλλες δοκιμές.

▼B

Β.6 ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παρατηρήσεις

Η ευαισθησία των δοκιμών και η ικανότητά τους να ανιχνεύσουν πιθανούς ευαισθητοποιητές του δέρματος του ανθρώπου θεωρούνται σημαντικά στοιχεία για ένα σύστημα ταξινόμησης της τοξικότητας που αφορά τη δημόσια υγεία.

Δεν υπάρχει μία ενιαία μέθοδος δοκιμής που να προσδιορίζει επαρκώς όλες τις ουσίες οι οποίες δύνανται να προκαλέσουν ευαισθητοποίηση του δέρματος του ανθρώπου και που να είναι κατάλληλη για όλες τις ουσίες.

Στην επιλογή μιας δοκιμής, πρέπει να ληφθούν υπόψη παράγοντες όπως τα φυσικά χαρακτηριστικά μιας ουσίας συμπεριλαμβανομένης και της ικανότητας της να διεισδύει στο δέρμα.

Έχουν αναπτυχθεί δύο τύποι δοκιμών που χρησιμοποιούν ινδικά χοιρίδια; οι δοκιμές με βοηθητική ουσία, όπου μια αλλεργική κατάσταση ενεργοποιείται με τη διάλυση ή την παρασκευή εναιωρήματος της εξεταζόμενης ουσίας στο Freunds Complete Adjuvant (FCA) και οι δοκιμές χωρίς βοηθητική ουσία.

Οι δοκιμές με βοηθητική ουσία είναι ενδεχομένως πιο ακριβείς στην πρόβλεψη πιθανής ευαισθητοποιητικής αντίδρασης μιας ουσίας στο δέρμα του ανθρώπου, σε σχέση με τις μεθόδους στις οποίες δεν χρησιμοποιείται FCA και κατά συνέπεια προτιμώνται.

Η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικό χοιρίδιο (ΔΜΙΧ) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη δοκιμή με βοηθητική ουσία. Αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι για την ανίχνευση της δυνατότητας μιας ουσίας να προκαλέσει αντίδραση ευαισθητοποίησης του δέρματος, η ΔΜΙΧ θεωρείται ότι είναι η προτιμότερη τεχνική με βοηθητική ουσία.

Για πολλές τάξεις χημικών ουσιών, οι δοκιμές χωρίς βοηθητική ουσία (από αυτές προτιμάται η δοκιμή Buehler) θεωρούνται λιγότερο ευαίσθητες.

Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι σκόπιμο να επιλεγεί η δοκιμή Buehler η οποία περιλαμβάνει τοπική εφαρμογή αντί της ενδοδερμικής έγχυσης που χρησιμοποιείται στη ΔΜΙΧ. Η χρησιμοποίηση της δοκιμής Buehler πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικά.

Στη μέθοδο αυτή περιγράφονται η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια (ΔΜΙΧ) και η δοκιμή Buehler. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι με την προϋπόθεση ότι είναι έγκυρες και ότι αιτιολογούνται επιστημονικά.

Εάν προκύψει θετικό αποτέλεσμα από μία αξιόπιστη προκαταρκτική δοκιμή, η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να χαρακτηρισθεί ως εν δυνάμει ευαισθητοποιός και ενδέχεται να μην είναι αναγκαία η διεξαγωγή ΔΜΙΧ. Ωστόσο, εάν προκύψει αρνητικό αποτέλεσμα σε μία τέτοια δοκιμή, θα πρέπει να γίνει η ΔΜΙΧ σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται κατωτέρω.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Ευαισθητοποίηση δέρματος: (αλλεργική δερματίτις εξ επαφής) δερματική αντίδραση ανοσολογικής φύσεως σε μια ουσία. Στον άνθρωπο, η αντίδραση αυτή μπορεί να χαρακτηρίζεται από κνησμό, ερύθημα, οίδημα, βλατίδες, φυσαλίδες, πομφόλυγες ή συνδυασμό αυτών. Σε άλλα είδη, οι αντιδράσεις είναι δυνατόν να διαφέρουν και να εμφανίζεται μόνο ερύθημα ή οίδημα

Έκθεση διέγερσης: πειραματική έκθεση υποκειμένου στην ελεγχόμενη ουσία με σκοπό την πρόκληση κατάστασης υπερευαισθησίας.

Περίοδος διέγερσης: περίοδος μιας τουλάχιστον εβδομάδας μετά την έκθεση διέγερσης κατά τη διάρκεια της οποίας είναι δυνατόν να εκδηλωθεί υπερευαισθησία.

Έκθεση πρόκλησης: πειραματική έκθεση, μετά την περίοδο διέγερσης, υποκειμένου εκτεθέντος προηγουμένως σε εξεταζόμενη ουσία, προκειμένου να διαπιστωθεί αν το υποκείμενο αυτό αντιδρά με υπερευαισθησία.

1.3. ΟΥΣΙΑΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η ευαισθησία και η αξιοπιστία της χρησιμοποιηθείσας πειραματικής τεχνικής πρέπει να αξιολογούνται ανά εξάμηνο με τη χρήση ουσιών οι οποίες είναι γνωστό ότι μπορούν να προκαλέσουν ήπια έως μέτρια ευαισθητοποίηση του δέρματος.

Εφόσον η δοκιμή έχει διεξαχθεί ορθά, θα πρέπει να αναμένεται για τους ήπιους έως μέτριους ευαισθητοποιητές ποσοστό απόκρισης τουλάχιστον 30 % στις δοκιμές με βοηθητική ουσία και τουλάχιστον 15 % στις δοκιμές χωρίς βοηθητική ουσία.

Προτιμούνται οι ακόλουθες ουσίες

Αριθ. CAS	Αρθ EINECS	Ονομασία EINECS	Κοινή Ονομασία
101-86-0	202-983-3	α-εξυλοκινναμαλδεύδη	α-εξυλοκινναμαλδεύδη
149-30-4	205-736-8	βενζοσειαζολο-2-θειόλη (μερκαπτοβενζοθειαζόλη)	kaptax
94-07-7	202-303-5	δενζοκαΐνη	νορκαίνη

Σε ορισμένες δεόντως αιτιολογημένες περιπτώσεις είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν άλλες ουσίες που πληρούν τα προαναφερθέντα κριτήρια.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Τα πειραματόζωα εκτίθενται αρχικά στη δοκιμαζόμενη ουσία με ενδοδερμικές ενέσεις και/ή επιδερμική επίθεση (έκθεση διέγερσης). Μετά από μια περίοδο ανάπαυσης 10 έως 14 ημερών (περίοδος διέγερσης), κατά τη διάρκεια της οποίας είναι δυνατόν να εμφανιστεί ανοσολογική αντίδραση, τα ζώα εκτίθενται σε μια δόση πρόκλησης Η έκταση και ο βαθμός της δερματικής αντίδρασης των πειραματοζώων στην έκθεση πρόκλησης συγκρίνεται με την αντίστοιχη αντίδραση των ζώων μαρτύρων τα οποία αφού εκτεθούν σε σκεύασμα placebo (κατά τη διέγερση) υποβάλλονται σε έκθεση πρόκλησης.

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΟΚΙΜΗΣ

Σε περίπτωση που απαιτείται απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας από το δέρμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί νερό ή κατάλληλος διαλύτης ώστε να μην αλλοιωθεί η εμφανισθείσα αντίδραση και να διατηρηθεί η ακεραιότητα της επιδερμίδας

▼B

1.5.1. *Δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικό χοιρίδιο (ΔΜΙΧ)*

1.5.1.1. Προετοιμασία

Υγιή νεαρά ενήλικα ινδικά χοιρίδια (albino) εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής Πριν από τη δοκιμή τα ζώα λαμβάνονται τυχαία και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής Το τρίχωμα αφαιρείται με κούρεμα, ξύρισμα ή, εφ όσον είναι δυνατόν, με χημική αποτρίχωση, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο δοκιμής Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η λύση της συνεχείας του δέρματος. Τα ζώα ζυγίζονται πριν από την έναρξη της δοκιμής και στο τέλος της·

1.5.1.2. Συνθήκες δοκιμής

1.5.1.2.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιούνται συνήθεις φυλές ινδικών χοιριδίων albino εργαστηρίου.

1.5.1.2.2. Αριθμός και φύλο

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρσενικά και/ή θηλυκά ζώα. Αν χρησιμοποιηθούν θηλυκά, αυτά θα πρέπει να είναι άτοκα και να μην ευρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

Για την ομάδα αγωγής χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 ζώα και για την ομάδα των μαρτύρων τουλάχιστον 5 ζώα. Όταν έχουν χρησιμοποιηθεί λιγότερα από 20 πειραματόζωα και λιγότερα από 10 ζώα-μάρτυρες και δεν είναι δυνατόν να συναχθεί συμπέρασμα για την ευαισθητοποιώ δράση της ουσίας, συνιστάται ιδιαιτέρως η διεξαγωγή δοκιμής και με άλλα ζώα ώστε να συμπληρωθεί ο αριθμός των 20 πειραματόζωων και 10 μαρτύρων τουλάχιστον.

1.5.1.2.3. Επίπεδα δόσεων

Η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση δοκιμαζόμενης ουσίας σε κάθε έκθεση διέγερσης πρέπει να είναι καλώς ανεκτή διασυστημικά και να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη συγκέντρωση που προκαλεί ήπιο έως μέτριας εντάσεως ερεθισμό του δέρματος. Η χρησιμοποιούμενη στην έκθεση πρόκλησης συγκέντρωση πρέπει να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη δόση που δεν προκαλεί ερεθισμό. Εφ όσον απαιτείται, οι κατάλληλες συγκεντρώσεις προσδιορίζονται από πιλοτική μελέτη με 2 ή 3 πειραματόζωα. Για το σκοπό αυτό, είναι σκόπιμο να χρησιμοποιούνται ζώα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με FCA.

1.5.1.3. Διαδικασία

1.5.1.3.1. Διέγερση

Ημέρα 0 — ομάδα αγωγής

Στην περιοχή του ώμου από την οποία έχει αφαιρεθεί προηγουμένως το τρίχωμα διενεργούνται τρία ζεύγη ενδοδερμικών ενέσεων των 0,1 ml, το καθένα εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης.

Ένεση 1: μείγμα FCA/νερό ή φυσιολογικό ορό αναλογίας 1:1 (v/v).

Ένεση 2: επιλεγμένη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας σε κατάλληλο φορέα.

Ένεση 3: παρασκεύασμα της ελεγχόμενης ουσίας στην επιλεγμένη συγκέντρωση σε μείγμα FCA/νερό ή φυσιολογικό ορό αναλογίας 1:1 (v/v).

Στην ένεση 3, οι υδατοδιαλυτές ουσίες διαλύονται στην υδατική φάση προτού αναμειχθούν με το FCA. Για τις λιποδιαλυτές ή αδιάλυτες ουσίες, σχηματίζεται εναιώρημα στο FCA προτού αναμειχθούν με την υδατική φάση. Η τελική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας ισούται με εκείνη της ένεσης 2.

▼B

Οι ενέσεις 1 και 2 διενεργούνται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους πολύ κοντά στο κεφάλι ενώ η ένεση 3 διενεργείται προς το ουραίο τμήμα της εξεταζόμενης περιοχής.

Ημέρα 0 — ομάδα μάρτυρας

Διενεργούνται τρία ζεύγη ενδοδερμικών ενέσεων των 0,1 ml στις ίδιες θέσεις με την ομάδα αγωγής.

Ένεση 1: μείγμα FCA/νερό ή φυσιολογικό ορό αναλογίας 1:1 (v/v).

Ένεση 2: μη αραιωμένος φορέας

Ένεση 3: παρασκεύασμα του φορέα σε συγκέντρωση 50 % w/v σε μείγμα FCA και νερού ή φυσιολογικού ορού αναλογίας 1:1 (v/v).

5η-7η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

Σε περίπτωση που η ουσία δεν είναι ερεθιστική για το δέρμα, είκοσι τέσσερις περίπου ώρες πριν αχό την τοπική εφαρμογή διέγερσης, και αφού προηγηθεί κούρεμα και/ή ξύρισμα του τριχώματος της εξεταζόμενης περιοχής αυτή επιχρίεται με 0,5 ml 10 % δωδεκυλοθειικού νατρίου σε βαζελίνη, προκειμένου να προκληθεί τοπικός ερεθισμός.

6η-8η ημέρα — ομάδα αγωγής

Αφαιρείται και πάλι το τρίχωμα από την εξεταζόμενη περιοχή. Διηθητικό χαρτί διαστάσεων 2 cm × 4 cm κορέννυται με την ελεγχόμενη ουσία σε κατάλληλο φορέα, εφαρμόζεται στην εξεταζόμενη περιοχή και διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 48 ώρες με πιεστικό επίδεσμο. Η επιλογή του φορέα πρέπει να αιτιολογείται. Ουσίες σε στερεή μορφή λεπτοκονιοποιούνται και ενσωματώνονται σε κατάλληλο φορέα. Υγρές ουσίες μπορούν να εφαρμόζονται χωρίς προηγούμενη αραίωση, εφόσον είναι σκόπιμο.

6η-8η ημέρα — ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται και πάλι το τρίχωμα από την εξεταζόμενη περιοχή στην οποία εφαρμόζεται στη συνέχεια μόνον ο φορέας με τον τρόπο που περιγράφεται ανωτέρω, και διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 48 ώρες με αδιαπέραστο επίδεσμο.

1.5.1.3.2. Πρόκληση

20ή-22η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται το τρίχωμα από τις πλευρές των ζώων της ομάδας αγωγής και της ομάδας μαρτύρων. Στη μία πλευρά των ζώων εφαρμόζεται επίθεμα ή κάψουλα με την ελεγχόμενη ουσία και εφόσον είναι σκόπιμο, στην άλλη πλευρά εφαρμόζεται επίθεμα ή κάψουλα που περιέχει μόνο φορέα. Τα επιθέματα διατηρούνται σε επαφή με το δέρμα επί 24 ώρες με αδιαπέραστο επίδεσμο.

1.5.1.3.3. Παρατήρηση και βαθμολόγηση: ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

— 21 περίπου ώρες μετά την απομάκρυνση του επιθέματος η περιοχή πρόκλησης καθαρίζεται, κουρεύεται και/ή ξυρίζεται και αποτριχώνεται εάν είναι αναγκαίο,

— 3 περίπου ώρες αργότερα (περίπου 48 ώρες από την έναρξη της πρόκλησης) παρατηρείται η αντίδραση του δέρματος και καταγράφεται σύμφωνα με τους βαθμούς του προσαρτήματος,

— 24 περίπου ώρες μετά την παρατήρηση αυτή, διενεργείται δεύτερη παρατήρηση (72 ώρες) η οποία και καταγράφεται.

Συνιστάται τυφλή ανάγνωση των αποτελεσμάτων από τα ζώα δοκιμής και τους μάρτυρες.

Εάν απαιτείται αποσαφήνιση των ληφθέντων αποτελεσμάτων από την πρώτη πρόκληση, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δεύτερης πρόκλησης (επαναπρόκλήση), μια εβδομάδα περίπου μετά την πρώτη, με νέα ομάδα μάρτυρα, εφόσον είναι αναγκαίο. Επαναπρόκληση μπορεί να διεξαχθεί και με την αρχική ομάδα μάρτυρα.

▼B

Όλες οι δερματικές αντιδράσεις και τα ασυνήθη ευρήματα, συμπεριλαμβανομένων των διασυστημικών αντιδράσεων, που προκύπτουν από τις διαδικασίες διέγερσης και πρόκλησης πρέπει να παρατηρούνται και να καταγράφονται σύμφωνα με την κλίμακα Magnusson/Kligman (βλ. προσάρτημα). Για την αποσαφήνιση αμφισβητήσιμων αντιδράσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες διαδικασίες όπως η ιστοπαθολογική εξέταση ή η μέτρηση του πάχους των πτυχώσεων του δέρματος.

1.5.2. *Δοκιμή Buehler*

1.5.2.1. Προετοιμασία

Υγιή νεαρά ενήλικα ινδικά χοιρίδια albino εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής. Πριν από τη δοκιμή, τα ζώα λαμβάνονται τυχαία και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής. Το τρίχωμα αφαιρείται με κούρεμα, ξύρισμα ή, εφ' όσον είναι δυνατόν με χημική αποτρίχωση, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο δοκιμής, Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η λύση της συνεχείας του δέρματος. Τα ζώα ζυγίζονται πριν από την έναρξη της δοκιμής και στο τέλος της.

1.5.2.2. Συνθήκες δοκιμής

1.52.2.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιούνται συνήθεις φυλές ινδικών χοιριδίων albino εργαστηρίου.

1.5.2.2.2. Αριθμός και φύλο

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρσενικά και/ή θηλυκά ζώα. Αν χρησιμοποιηθούν θηλυκά, αυτά πρέπει να είναι άτοκα και να μην ευρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης

Για την ομάδα αγωγής χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 20 ζώα και για την ομάδα των μαρτύρων τουλάχιστον 10 ζώα.

1.5.2.2.3. Επίπεδα δόσεων

Η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση δοκιμαζόμενης ουσίας σε κάθε έκθεση διέγερσης πρέπει να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη δυνατή συγκέντρωση που προκαλεί ήπιο αλλά όχι υπέρμετρο ερεθισμό. Η χρησιμοποιούμενη στην έκθεση πρόκλησης συγκέντρωση πρέπει να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη δόση που δεν προκαλεί ερεθισμό. Εφόσον απαιτείται, οι κατάλληλες συγκεντρώσεις προσδιορίζονται από πιλοτική μελέτη με 2 ή 3 πειραματόζωα.

Για τις υδατοδιαλυτές ουσίες ως φορέας συνίσταται το νερό ή αραιό διάλυμα μη ερεθιστικής τασιενεργού ουσίας. Για τις άλλες ελεγχόμενες ουσίες προτιμάται η χρήση μείγματος 80 % αιθανόλης/νερού στην έκθεση διέγερσης και ακετόνης στην έκθεση πρόκλησης

1.5.2.3. Διαδικασία

1.5.2.3.1. Διέγερση

Ημέρα 0 — ομάδα αγωγής

Αφαιρείται το τρίχωμα από τη μια πλευρά του ζώου {με κούρεμα). Το επίθεμα δοκιμής κορέννυται με ελεγχόμενη ουσία, σε κατάλληλο φορέα (η επιλογή του φορέα πρέπει να αιτιολογείται· υγρές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιούνται, αν είναι σκόπιμο, χωρίς προηγούμενη αραίωση). Το επίθεμα δοκιμής εφαρμόζεται επί της εξεταζόμενης περιοχής και διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 6 ώρες με τη βοήθεια αδιαπέραστου επιδέσμου ή κάψουλας και καταλλήλου επιδέσμου.

▼B

Το επίθεμα δοκιμής πρέπει να είναι αδιαπέραστο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στρογγυλό ή τετράγωνο επικάλλυμα από βαμβάκι διαστάσεων 4-6 cm^2 περίπου. Θεωρείται σκόπιμη η χρησιμοποίηση διάταξης συγκράτησης για την εξασφάλιση της αδιαπερατότητας. Σε περίπτωση περιτύλιξης της υπό αγωγή περιοχής ενδέχεται να απαιτηθούν επιπλέον εκθέσεις στην ουσία.

Ημέρα 0 — ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται το τρίχωμα από τη μια πλευρά του ζώου (με κούρεμα). Εφαρμόζεται μόνον ο φορέας με τον τρόπο που περιγράφεται για την ομάδα αγωγής. Το επίθεμα δοκιμής διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 6 ώρες με τη βοήθεια αδιαπέραστου επιδέσμου ή κάψουλας και κατάλληλου επιδέσμου. Εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ότι η δοκιμή με σκεύασμα placebo σε ομάδα μάρτυρα δεν είναι αναγκαία, επιτρέπεται να χρησιμοποιηθεί ομάδα μάρτυρας στην οποία δεν χορηγείται καμία ουσία.

6η-8η και I3η-!5η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

την 6η-8η ημέρα και επίσης την 13η-15η ημέρα, πραγματοποιείται η ίδια εργασία όπως και την ημέρα 0 στην ίδια εξεταζόμενη περιοχή (μετά από αφαίρεση του τριχώματος αν είναι αναγκαίο) της ίδιας πλευράς.

1.5.2.3.2. Πρόκληση

27η-29η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται το τρίχωμα (με κούρεμα) από την άλλη πλευρά των ζώων αγωγής και ζώων μαρτύρων η οποία δεν έχει εκτεθεί στην ελεγχόμενη ουσία. Στο οπίσθιο τμήμα της πλευράς αυτής εφαρμόζεται αδιαπέραστος επίδεσμος ή κάψουλα που περέχει κατάλληλη ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας στη μέγιστη συγκέντρωση που δεν προκαλεί ερεθισμό.

Όταν είναι σκόπιμο, εφαρμόζεται στο εμπρόσθιο μέρος της ίδιας πλευράς των ζώων αγωγής και των ζώων μαρτύρων αδιαπέραστος επίδεσμος ή κάψουλα που περιέχει μόνο φορέα. Τα επιθέματα ή οι κάψουλες διατηρούνται σε επαφή με το δέρμα επί 6 ώρες με τη βοήθεια κατάλληλου επιδέσμου.

1.5.2.3.3. Παρατήρηση και βαθμολόγηση

— περίπου 21 ώρες μετά την απομάκρυνση του επιθέματος αφαιρείται το τρίχωμα από την περιοχή πρόκλησης,

— περίπου τρεις ώρες αργότερα (δηλαδή 30 περίπου ώρες μετά την εφαρμογή του επιθέματος πρόκλησης) παρατηρούνται οι αντιδράσεις του δέρματος και καταγράφονται σύμφωνα με τους βαθμούς του προσαρτήματος,

— περίπου 24 ώρες μετά την τριαντακοντάωρη παρατήρηση (δηλαδή 54 περίπου ώρες μετά την εφαρμογή του επιθέματος πρόκλησης) παρατηρούνται εκ νέου και καταγράφονται οι αντιδράσεις του δέρματος.

Συνίσταται τυφλή ανάγνωση των αποτελεσμάτων από τα ζώα δοκιμής και τους μάρτυρες.

Εάν απαιτείται αποσαφήνιση των ληφθέντων αποτελεσμάτων από την πρώτη πρόκληση, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δεύτερης πρόκλησης (επαναπρόκληση), μια εβδομάδα περίπου μετά την πρώτη, με νέα ομάδα μάρτυρα, εφόσον είναι αναγκαίο. Επαναπρόκληση μπορεί να διεξαχθεί και με την αρχική ομάδα μάρτυρα.

▼B

Όλες οι δερματικές αντιδράσεις και τα ασυνήθη ευρήματα, συμπεριλαμβανομένων των διασυστημικών αντιδράσεων, που προκύπτουν από τις διαδικασίες διέγερσης και πρόκλησης πρέπει να παρατηρούνται και να καταγράφονται σύμφωνα με την κλίμακα Magnusson/Kligman (βλέπε προσάρτημα). Για την αποσαφήνιση αμφισβητήσιμων αντιδράσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες διαδικασίες όπως η ιστοπαθολογική εξέταση ή η μέτρηση του πάχους των πτυχώσεων του δέρματος.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ (ΔΜΙΧ ΚΑΙ ΔΟΚΙΜΗ BUEHLER)**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα στον οποίο παρουσιάζονται για κάθε ζώο οι δερματικές αντιδράσεις που αντιστοιχούν σε κάθε παρατήρηση.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ (ΔΜΙΧ ΚΑΙ ΔΟΚΙΜΗ BUEHLER)**

Σε περίπτωση που πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική δοκιμή πριν από τη δοκιμή με ινδικά χοιρίδια παρέχονται περιγραφή ή τα στοιχεία αναφοράς της δοκιμής (επί παραδείγματι, δοκιμή τοπικού λεμφαδένα — LLNA, δοκιμή οιδήματος αυτιού ποντικού — MEST) συμπεριλαμβανομένων των λεπτομερειών της διαδικασίας καθώς και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν τόσο με την ελεγχόμενη ουσία όσο και με τις ουσίες αναφοράς.

Έκθεση δοκιμής (ΔΜΙΧ και δοκιμή Buehler)

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

Για τα πειραματόζωα:

— φυλή των χρησιμοποιηθέντων ινδικών χοιριδίων,

— αριθμός ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης διατροφής κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Για τις συνθήκες δοκιμής:

— τεχνική προετοιμασίας της περιοχής εφαρμογής της ουσίας,

— λεπτομέρειες σχετικά με το επιδεσμικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε και την τεχνική της εφαρμογής του,

— αποτέλεσμα της πιλοτικής μελέτης και πόρισμα σχετικά με τις συγκεντρώσεις διέγερσης και πρόκλησης που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή,

— λεπτομέρειες για την προετοιμασία, εφαρμογή και απομάκρυνση της ουσίας,

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— συγκεντρώσεις φορέα και δοκιμαζόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκθέσεις διέγερσης και πρόκλησης και συνολική ποσότητα ουσίας που εφαρμόστηκε για διέγερση και πρόκληση.

Για τα αποτελέσματα:

— περίληψη των αποτελεσμάτων του τελευταίου ελέγχου ευαισθησίας και αξιοπιστίας (βλέπε 1.3) συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών για την ουσία, τη συγκέντρωση και το φορέα που χρησιμοποιήθηκαν,

▼B

— πληροφορίες για κάθε ζώο συμπεριλαμβανομένου του συστήματος βαθμολόγησης,

— αναλυτική περιγραφή της φύσης και του βαθμού των εκδηλώσεων που παρατηρήθηκαν,

— τυχόν ιστοπαθολογικά ευρήματα.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Η παρούσα μέθοδος είναι παραπλήσια της ΤΟ 406 του ΟΟΣΑ.

▼B

Προσάρτημα

ΠΙΝΑΚΑΣ:

Κλίμακα Magnusson/Kligman για την αξιολόγηση των αντιδράσεων στη δοκιμή πρόκλησης με επίθεμα

0 = καμία ορατή μεταβολή

1 = διακριτικό ή πλακώδες ερύθημα

2 = μέτριας έντασης και συρρέον ερύθημα

3 = έντονο ερύθημα και οίδημα.

▼M4

Β.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ, 28 ΗΜΕΡΩΝ, ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 407 του ΟΟΣΑ (2008). Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 407 εκδόθηκε το 1981. Το 1995 εκδόθηκε αναθεωρημένη έκδοση για τη λήψη πρόσθετων πληροφοριών από τα ζώα που χρησιμοποιούνται στη μελέτη, ιδίως όσον αφορά τη νευροτοξικότητα και την ανοσοτοξικότητα.

2. Το 1998 ο ΟΟΣΑ δρομολόγησε μια δραστηριότητα πρώτης προτεραιότητας με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών και την ανάπτυξη νέων για τη διαλογή και τη δοκιμή δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών (8). Ένα στοιχείο της δραστηριότητας αφορούσε την επικαιροποίηση της υφιστάμενης κατευθυντήριας γραμμής του ΟΟΣΑ για τη «Μελέτη τοξικότητας από το στόμα, 28 ημερών, με επαναλαμβανόμενη δόση σε τρωκτικά» (TG 407) με παραμέτρους κατάλληλες για την ανίχνευση της ενδοκρινικής δραστικότητας των ελεγχόμενων χημικών ουσιών. Η διαδικασία αυτή υπήχθη σε εκτεταμένο διεθνές πρόγραμμα δοκιμών για τον έλεγχο της καταλληλότητας και της δυνατότητας πρακτικής εφαρμογής των επιπρόσθετων παραμέτρων, των επιδόσεων των παραμέτρων αυτών στην περίπτωση των χημικών ουσιών με (αντι)οιστρογόνο, (αντι)ανδρογόνο και (αντι)θυρεοειδική δράση, της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και της αλληλεπίδρασης των νέων παραμέτρων με αυτές που απαιτούνταν βάσει της προηγούμενης TG 407. Προέκυψε μεγάλος όγκος δεδομένων, τα οποία συγκεντρώθηκαν και αξιολογήθηκαν αναλυτικά σε εκτενή έκθεση του ΟΟΣΑ (9). Η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών Β.7 (ισοδύναμη με την TG 407) είναι το αποτέλεσμα της πείρας και των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια του διεθνούς προγράμματος δοκιμών. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών επιτρέπει το συσχετισμό ορισμένων ενδοκρινικών επιδράσεων με άλλες τοξικολογικές επιδράσεις.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

3. Κατά την εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας χημικής ουσίας, μπορεί να προσδιοριστεί η τοξικότητά της από το στόμα με τη χρήση επαναλαμβανόμενης δόσης μετά τη λήψη αρχικών πληροφοριών για την τοξικότητα μέσω δοκιμών οξείας τοξικότητας. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αποσκοπεί στη διερεύνηση των επιδράσεων σε ένα ευρύτατο φάσμα δυνητικών στόχων τοξικότητας. Παρέχει πληροφορίες για τους πιθανούς κινδύνους για την υγεία που ενδέχεται να προκληθούν από την επανειλημμένη έκθεση για σχετικά περιορισμένο χρονικό διάστημα, συμπεριλαμβανομένων των επιδράσεων στο νευρικό, το ανοσοποιητικό και το ενδοκρινικό σύστημα. Όταν αφορά αυτά τα συγκεκριμένα καταληκτικά σημεία, προβλέπεται ότι η μέθοδος εντοπίζει τις χημικές ουσίες με νευροτοξικό δυναμικό, πράγμα το οποίο μπορεί να δικαιολογεί περαιτέρω εις βάθος διερεύνηση του θέματος, και τις χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη φυσιολογία του θυρεοειδούς. Η μέθοδος μπορεί επίσης να παρέχει δεδομένα για χημικές ουσίες που προσβάλλουν τα αναπαραγωγικά όργανα νεαρών ενήλικων αρσενικών και θηλυκών ζώων, καθώς και ενδείξεις για τις επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα.

4. Τα αποτελέσματα της παρούσας μεθόδου δοκιμών Β.7 θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό και την εκτίμηση των κινδύνων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις σχετικές με το ενδοκρινικό σύστημα παραμέτρους θα πρέπει να μελετώνται στο πλαίσιο του εννοιολογικού πλαισίου για τον έλεγχο και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) του ΟΟΣΑ (11). Η μέθοδος περιλαμβάνει τη βασική μελέτη τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση, που μπορεί να χρησιμοποιείται για χημικές ουσίες για τις οποίες δεν δικαιολογείται η διεξαγωγή μελέτης 90 ημερών (π.χ. όταν ο όγκος παραγωγής δεν υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια) ή ως προκαταρκτικό στάδιο μιας μακροπρόθεσμης μελέτης. Η διάρκεια της έκθεσης θα πρέπει να είναι 28 ημέρες.

▼M4

5. Το διεθνές πρόγραμμα που εφαρμόστηκε με σκοπό την επικύρωση παραμέτρων κατάλληλων για τη δυνητική ενδεχόμενη ανίχνευση της ενδοκρινικής δραστικότητας ελεγχόμενων χημικών ουσιών κατέδειξε ότι η ποιότητα των δεδομένων που λαμβάνονται με την παρούσα μέθοδο δοκιμών Β.7 εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πείρα του εργαστηρίου. Αυτό αφορά συγκεκριμένα τον ιστοπαθολογικό προσδιορισμό των κυκλικών αλλαγών στα θηλυκά αναπαραγωγικά όργανα και τον προσδιορισμό του βάρους των μικρών ορμονοεξαρτώμενων οργάνων που είναι δύσκολο να ανατμηθούν. Έχουν καταρτιστεί έγγραφα καθοδήγησης σχετικά με την ιστοπαθολογία (19), τα οποία είναι διαθέσιμα στον δημόσιο δικτυακό τόπο του ΟΟΣΑ για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών. Σκοπός τους είναι να βοηθούν τους παθολογοανατόμους στις εξετάσεις τους και να συμβάλλουν στην αύξηση της ευαισθησίας της δοκιμασίας. Διαπιστώθηκε ότι διάφορες παράμετροι είναι ενδεικτικές ενδοκρινικής τοξικότητας και έχουν ενσωματωθεί στη μέθοδο δοκιμών. Προτείνονται ως προαιρετικά καταληκτικά σημεία παράμετροι για τις οποίες τα διαθέσιμα δεδομένα δεν επαρκούσαν για την απόδειξη της χρησιμότητάς τους ή για τις οποίες δεν προέκυψαν από το πρόγραμμα επικύρωσης ισχυρές αποδείξεις της ικανότητάς τους να συμβάλλουν στην ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών (βλέπε προσάρτημα 2).

6. Βάσει των δεδομένων που προέκυψαν από τη διαδικασία επικύρωσης, πρέπει να τονιστεί ότι η ευαισθησία της παρούσας δοκιμασίας δεν επαρκεί για τον εντοπισμό όλων των ουσιών που έχουν (αντι)ανδρογόνο ή (αντι)οιστρογόνο δράση (9). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια των σταδίων της ζωής που είναι περισσότερο ευαίσθητα στην ενδοκρινική διαταραχή. Μολαταύτα, μέσω της μεθόδου εντοπίστηκαν, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επικύρωσης, ουσίες με ασθενή και ισχυρή επίδραση στη λειτουργία του θυρεοειδούς, καθώς και ουσίες με ισχυρή και μέτρια ενδοκρινική δραστικότητα, οι οποίες δρουν μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων ή ανδρογόνων. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν κατέστη δυνατός ο εντοπισμός ενδοκρινικώς δραστικών ουσιών που προσβάλλουν ασθενώς τους υποδοχείς οιστρογόνων ή ανδρογόνων. Συνεπώς, η μέθοδος δεν μπορεί να περιγραφεί ως δοκιμασία διαλογής για ενδοκρινική δραστικότητα.

7. Κατά συνέπεια, η απουσία αποτελεσμάτων σε σχέση με αυτούς τους τρόπους δράσης δεν μπορεί να θεωρηθεί ως απόδειξη της απουσίας επιδράσεων στο ενδοκρινικό σύστημα. Επομένως, όσον αφορά τις επιδράσεις μέσω του ενδοκρινικού συστήματος, ο χαρακτηρισμός των ουσιών θα πρέπει να μη βασίζεται μόνο στα αποτελέσματα της παρούσας μεθόδου δοκιμών, αλλά να χρησιμοποιείται σε μια προσέγγιση βάσει του βάρους της μαρτυρίας, που να περιλαμβάνει όλα τα υπάρχοντα δεδομένα για μια χημική ουσία για τον χαρακτηρισμό της δυνητικής ενδοκρινικής δραστικότητας. Για τον λόγο αυτό, η λήψη κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με την ενδοκρινική δραστικότητα (χαρακτηρισμός ουσιών) θα πρέπει να αποτελεί ευρεία προσέγγιση που δεν βασίζεται αποκλειστικά στα αποτελέσματα της εφαρμογής της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

8. Είναι παραδεκτό ότι σε όλες οι διαδικασίες που βασίζονται σε ζώα πρέπει να τηρούνται τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των ζώων. Η κατωτέρω περιγραφόμενη φροντίδα και μεταχείριση αποτελεί ελάχιστο πρότυπο επιδόσεων και αντικαθίσταται από τους τοπικούς κανονισμούς στις περιπτώσεις που αυτοί είναι αυστηρότεροι. Περισσότερες κατευθύνσεις για την καλή μεταχείριση των ζώων παρέχονται από τον ΟΟΣΑ (14).

9. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται από το στόμα σε ημερήσιες διαβαθμισμένες δόσεις, σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων: ένα επίπεδο δόσης ανά ομάδα, για περίοδο 28 ημερών. Τα ζώα εξετάζονται με προσοχή καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης για τη διαπίστωση τοξικών εκδηλώσεων. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται με ευθανασία κατά τη διάρκεια της δοκιμής νεκροτομούνται, ενώ στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται με ευθανασία και νεκροτομούνται επίσης. Η μελέτη των 28 ημερών παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις της επανειλημμένης έκθεσης από το στόμα και μπορεί να καταδείξει την ανάγκη για περαιτέρω, πιο μακροπρόθεσμες μελέτες. Επίσης,

▼M4

μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την επιλογή συγκεντρώσεων για πιο μακροπρόθεσμες μελέτες. Τα δεδομένα που προκύπτουν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών προβλέπεται να επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό της τοξικότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, να παρέχουν ενδείξεις για τη σχέση δόσης-απόκρισης και να επιτρέπουν τον προσδιορισμό του επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

11. Το προτιμότερο είδος τρωκτικών είναι ο επίμυς, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη τρωκτικών. Η διερεύνηση των παραμέτρων που προσδιορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών B.7 σε άλλα είδη τρωκτικών πρέπει να αιτιολογείται αναλυτικά. Παρόλο που είναι βιολογικά πιθανοφανές ότι άλλα είδη θα πρέπει να αντιδρούν στις τοξικές ουσίες κατά τρόπο παρόμοιο με τον επίμυ, η χρήση μικρότερων ειδών ενδέχεται να οδηγήσει σε αυξημένη μεταβλητότητα, λόγω των τεχνικών προκλήσεων που συνεπάγεται η ανατομή μικρότερων οργάνων. Στο διεθνές πρόγραμμα επικύρωσης για την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών, ο επίμυς ήταν το μόνο είδος που χρησιμοποιήθηκε. Πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά, υγιή ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Η χορήγηση της ουσίας πρέπει να αρχίζει το ταχύτερο δυνατό μετά τον απογαλακτισμό και, οπωσδήποτε, σε ηλικία μικρότερη των εννέα εβδομάδων. Στην αρχή της μελέτης, η διακύμανση των βαρών των χρησιμοποιούμενων ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % της μέσης τιμής, για κάθε φύλο. Σε περίπτωση που διεξάγεται μελέτη με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα ως προκαταρκτικό στάδιο πιο μακροπρόθεσμης μελέτης, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης και στις δύο μελέτες.

Στέγαση και διατροφή

12. Σε όλες οι διαδικασίες πρέπει να τηρούνται τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των πειραματόζωων. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Παρόλο που η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τα διαστήματα του καθαρισμού της αίθουσας, το επιδιωκόμενο επίπεδο θα πρέπει να είναι 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος 12ωρη. Όσον αφορά τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με παροχή απεριόριστου πόσιμου νερού. Η επιλογή του σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη κατάλληλης πρόσμιξης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, όταν αυτή χορηγείται με την παρούσα μέθοδο. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου. Επιτρέπεται η ατομική στέγαση, εάν αιτιολογείται επιστημονικά. Σε περίπτωση ομαδικής στέγασης, κάθε κλωβός δεν πρέπει να περιέχει περισσότερα από πέντε ζώα.

13. Η τροφή πρέπει να υποβάλλεται τακτικά σε ανάλυση ώστε να εντοπίζονται τυχόν ξένες προσμείξεις. Ένα δείγμα του σιτηρεσίου θα πρέπει να διατηρείται έως την οριστικοποίηση της έκθεσης.

Προετοιμασία των ζώων

14. Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα κατανέμονται τυχαία σε ομάδες-μάρτυρες και ομάδες αγωγής. Η διάταξη των κλωβών στον χώρο πρέπει να ελαχιστοποιεί τις οφειλόμενες στη θέση τους επιδράσεις. Τα ζώα σημαδεύονται και διατηρούνται στους κλωβούς τους επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της αγωγής, προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου.

Παρασκευή των δόσεων

15. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα ή μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού. Η τεχνική χορήγησης της ουσίας από το στόμα εξαρτάται από τον σκοπό της μελέτης και από τις φυσικές/χημικές/τοξικοκινητικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

▼M4

16. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται να εξετάζεται ως πρώτη επιλογή, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, έπειτα η χρήση διαλύματος/εναιωρήματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και, ως τελευταία επιλογή, η χρήση διαλύματος σε άλλο φορέα. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά του και να προσδιορίζεται η σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον φορέα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

17. Για κάθε επίπεδο δόσεων πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 ζώα (πέντε θηλυκά και πέντε αρσενικά). Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, ο αριθμός των ζώων ανά ομάδα πρέπει να αυξάνεται κατά τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης επιπρόσθετης δορυφορικής ομάδας δέκα ζώων (πέντε ανά φύλο) στην ομάδα-μάρτυρα και στην ομάδα μέγιστης δόσης, με σκοπό την παρατήρηση της αναστρεψιμότητας, της εμμονής ή της καθυστερημένης εμφάνισης τοξικών επιδράσεων επί 14 ημέρες τουλάχιστον μετά την αγωγή.

Δοσολογία

18. Γενικά, πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες δοκιμής και μία ομάδα-μάρτυρας. Ωστόσο, αν από την αξιολόγηση άλλων δεδομένων προκύπτει ότι η χορήγηση ημερήσιας δόσης 1 000 mg/kg βάρους σώματος δεν αναμένεται να έχει επίδραση, μπορεί να διεξάγεται οριακή δοκιμή. Εάν δεν διατίθενται κατάλληλα δεδομένα, είναι δυνατόν να εκπονηθεί μελέτη καθορισμού του εύρους (ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης) για να διευκολύνει τον καθορισμό των δόσεων που θα χρησιμοποιηθούν. Με εξαίρεση την αγωγή με την ελεγχόμενη χημική ουσία, τα ζώα της ομάδας-μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση με τα ζώα της ομάδας δοκιμής. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, η ομάδα-μάρτυρας πρέπει να λαμβάνει τον φορέα στον μέγιστο χρησιμοποιούμενο όγκο.

19. Για την επιλογή των επιπέδων δόσης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τυχόν διαθέσιμα τοξικολογικά και (τοξικο-)κινητικά δεδομένα που αφορούν την ελεγχόμενη χημική ουσία ή συγγενείς με αυτή ουσίες. Η υψηλότερη δόση πρέπει να επιλέγεται με σκοπό να επιφέρει τοξικές επιδράσεις αλλά όχι τον θάνατο ή μεγάλη ταλαιπωρία. Στη συνέχεια, επιλέγεται φθίνουσα σειρά δόσεων, έτσι ώστε να καταδειχθούν η σχέση της απόκρισης με τη δόση και η χαμηλότερη δόση στην οποία δεν παρατηρούνται τοξικές επιδράσεις (NOAEL). Συχνά, η βέλτιστη επιλογή για τον καθορισμό των ελαττούμενων δόσεων είναι τα υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα μεταξύ αυτών, ενώ είναι πολλές φορές προτιμότερο να προστίθεται μια τέταρτη ομάδα δοκιμής αντί να χρησιμοποιούνται εξαιρετικά μεγάλα διαστήματα μεταξύ των δόσεων (π.χ. με λόγο ακολουθίας μεγαλύτερο από 10).

20. Όταν παρατηρείται γενική τοξικότητα (π.χ. μειωμένο βάρος σώματος, επιδράσεις στο ήπαρ, την καρδιά, τους πνεύμονες ή τα νεφρά κ.λπ.) ή άλλη αλλαγή που μπορεί να μην είναι τοξική αντίδραση (π.χ. μειωμένη πρόσληψη τροφής, διόγκωση του ήπατος), οι παρατηρούμενες επιδράσεις στα καταληκτικά σημεία που συνδέονται με ευαισθησία του ανοσοποιητικού, του νευρικού ή του ενδοκρινικού συστήματος θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.

Οριακή δοκιμή

21. Εάν μια δοκιμή σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα ή, εφόσον πρόκειται για χορήγηση μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού, με αντίστοιχη εκατοστιαία αναλογία στο σιτηρέσιο ή στο πόσιμο νερό (σε σχέση με το βάρος του σώματος), δεν έχει ως αποτέλεσμα παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις και εάν, βάσει των διαθέσιμων δεδομένων για χημικές ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται τοξικότητα, η πλήρης μελέτη με τρία επίπεδα δόσης μπορεί να μην είναι απαραίτητη. Η οριακή δοκιμή εφαρμόζεται εφόσον η έκθεση του ανθρώπου δεν καταδεικνύει την ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλοτέρου επίπεδου δόσης.

▼M4

Χορήγηση των δόσεων

22. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται στα ζώα καθημερινά επί 7 ημέρες την εβδομάδα για περίοδο 28 ημερών. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται εφάπαξ με τη βοήθεια στομαχικού καθετήρα ή κατάλληλης διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου και δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml / 100 g βάρους σώματος ή, εάν πρόκειται για υδατικό διάλυμα, τα 2 ml / 100 g βάρους σώματος. Εκτός από την περίπτωση των ερεθιστικών ή διαβρωτικών χημικών ουσιών, οι οποίες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προκαλούν κατά κανόνα έξαρση των επιδράσεων, η μεταβλητότητα των όγκων δοκιμής πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

23. Για τις χημικές ουσίες που χορηγούνται μέσω του σιτηρεσίου ή του πόσιμου νερού έχει σημασία να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες ελεγχόμενης χημικής ουσίας δεν παρεμποδίζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του σιτηρεσίου, πρέπει να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στο σιτηρέσιο (ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης, εκφρασμένο επί του βάρους σώματος του ζώου, και να διευκρινίζεται ποια από τις δύο δυνατότητες έχει επιλεγεί. Για χημικές ουσίες που χορηγούνται με καθετήρα, η δόση πρέπει να χορηγείται την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα και να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε να διατηρείται σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος. Σε περίπτωση που η μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης διεξάγεται ως προκαταρκτικό στάδιο μακροπρόθεσμης μελέτης, πρέπει να χρησιμοποιείται παρόμοιο σιτηρέσιο και στις δύο μελέτες.

Παρατηρήσεις

24. Η περίοδος παρατήρησης διαρκεί 28 ημέρες. Τα ζώα των δορυφορικών ομάδων που προορίζονται για μεταπαρακολούθηση πρέπει να αναμένουν τουλάχιστον 14 ημέρες χωρίς να υποβληθούν σε αγωγή, προκειμένου να διαπιστώνεται καθυστερημένη εμφάνιση ή εμμονή τοξικών επιδράσεων ή ανάρρωση από αυτές.

25. Γενικές κλινικές παρατηρήσεις πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον μια φορά ημερησίως, κατά προτίμηση την (τις) ίδια(-ες) ώρα(-ες) και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Η κατάσταση της υγείας των ζώων πρέπει να καταγράφεται. Όλα τα ζώα εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως για τη διαπίστωση νοσηρότητας και θνησιμότητας.

26. Όλα τα ζώα πρέπει να υποβάλλονται σε λεπτομερή κλινική παρατήρηση μία φορά πριν από την πρώτη έκθεση (προκειμένου να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ζώων) και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μια φορά εβδομαδιαίως. Οι παρατηρήσεις αυτές πρέπει να γίνονται, κατά προτίμηση, την ίδια ώρα της ημέρας, σε τυποποιημένο χώρο έξω από τους κλωβούς κάθε φορά, και να καταγράφονται προσεκτικά, κατά προτίμηση με τη χρήση συστημάτων βαθμολόγησης τα οποία καθορίζει λεπτομερώς το εργαστήριο. Πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια ώστε οι συνθήκες της δοκιμής να παρουσιάζουν την ελάχιστη δυνατή μεταβλητότητα και οι παρατηρήσεις να γίνονται κατά προτίμηση από άτομα που δεν γνωρίζουν την αγωγή. Καταγράφονται, μεταξύ άλλων, οι αλλαγές στο δέρμα, στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς, στους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις, καθώς και συμπτώματα από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (όπως δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή της διαμέτρου της κόρης του οφθαλμού, ασύνηθες αναπνευστικό πρότυπο). Καταγράφονται επίσης οι αλλαγές στο βάδισμα, στη στάση του σώματος και στην αντίδραση κατά τη μεταχείριση, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση, συνεχείς περιστροφές) ή περίεργης συμπεριφοράς (όπως αυτοακρωτηριασμός, βάδισμα προς τα πίσω) (2).

27. Την τέταρτη εβδομάδα έκθεσης αξιολογούνται οι αντιδράσεις των αισθητηρίων οργάνων σε διαφόρων ειδών ερεθίσματα (2) (π.χ. ακουστικά, οπτικά και ιδιοδεκτικά ερεθίσματα) (3)(4)(5), η δύναμη της λαβής (6) και η κινητικότητα (7). Λεπτομέρειες σχετικά με τις διαδικασίες που μπορούν να ακολουθούνται παρέχονται στις αντίστοιχες βιβλιογραφικές παραπομπές. Ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές διαδικασίες αντί των αναφερόμενων στις παραπομπές.

▼M4

28. Οι παρατηρήσεις των λειτουργιών κατά την τέταρτη εβδομάδα έκθεσης μπορούν να παραλείπονται, εάν η μελέτη εκπονείται ως προκαταρτικό στάδιο μελέτης υποχρόνιας τοξικότητας (90 ημερών). Στην περίπτωση αυτή, οι παρατηρήσεις των λειτουργιών θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην επόμενη αυτή μελέτη. Από την άλλη πλευρά όμως, η ύπαρξη δεδομένων για τις λειτουργίες από τη μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης μπορεί να διευκολύνει την επιλογή επιπέδων δόσης για τη μετέπειτα μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας.

29. Κατ' εξαίρεση, οι παρατηρήσεις των λειτουργιών μπορούν επίσης να παραλείπονται όταν οι ομάδες εμφανίζουν εκδηλώσεις τοξικότητας σε βαθμό που παρεμποδίζει σημαντικά τις επιδόσεις της λειτουργικής δοκιμής.

30. Κατά τη νεκροψία είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ο κύκλος οίστρου όλων των θηλυκών ζώων (προαιρετικά) με τη λήψη κολπικών επιχρισμάτων. Οι παρατηρήσεις αυτές παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το στάδιο του κύκλου οίστρου κατά τον χρόνο θανάτωσης και βοηθούν στην ιστολογική αξιολόγηση των ευαίσθητων στα οιστρογόνα ιστών [βλέπε καθοδήγηση σχετικά με την ιστοπαθολογία (19)].

Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής και νερού

31. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται τουλάχιστον μια φορά ανά εβδομάδα. Με την ίδια συχνότητα πρέπει να μετράται η κατανάλωση τροφής. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού, η κατανάλωσή του πρέπει επίσης να μετράται τουλάχιστον μια φορά ανά εβδομάδα.

Αιματολογία

32. Στο τέλος της περιόδου δοκιμής πρέπει να διεξάγονται οι ακόλουθες αιματολογικές εξετάσεις: προσδιορισμός αιματοκρίτη, συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων, δικτυοερυθροκυττάρων, αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων και λευκοκυτταρικού τύπου, αριθμού αιμοπεταλίων, χρόνου πήξεως και πηκτικότητας του αίματος. Εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία ή οι θεωρητικοί μεταβολίτες της έχουν οξειδωτικές ιδιότητες, θα πρέπει να προσδιορίζονται επίσης, μεταξύ άλλων, η συγκέντρωση μεθαιμοσφαιρίνης και τα σωμάτια Heinz.

33. Τα δείγματα αίματος πρέπει να λαμβάνονται από καθορισμένο σημείο ακριβώς πριν από τη θανάτωση των ζώων ή κατά τη διάρκειά της και να διατηρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες. Τα ζώα πρέπει να υποβάλλονται σε ολονύκτια νηστεία πριν από την ευθανασία ([1]).

Κλινική βιοχημεία

34. Πρέπει να διεξάγονται βιοχημικές εξετάσεις για τη διερεύνηση σοβαρών τοξικών επιδράσεων στους ιστούς, και ειδικότερα στα νεφρά και στο ήπαρ, σε δείγματα αίματος που έχουν ληφθεί από όλα τα ζώα αμέσως πριν από τη θανάτωσή τους ζώων ή κατά τη διάρκειά της (δεν λαμβάνεται αίμα από ετοιμοθάνατα ζώα και/ή από ζώα που θανατώνονται πριν από το τέλος της δοκιμής). Οι εξετάσεις πλάσματος ή ορού αίματος περιλαμβάνουν προσδιορισμό νατρίου, καλίου, γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, ουρίας, κρεατινίνης, ολικών πρωτεϊνών και αλβουμίνης, δύο τουλάχιστον ενζύμων που είναι ενδεικτικά ηπατοκυτταρικών επιδράσεων (όπως η αλανινο-αμινοτρανσφεράση, η ασπαραγινική αμινοτρασφεράση, η αλκαλική φωσφατάση, η γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση και η γλουταμική αφυδρογονάση) και χολικών οξέων. Η μέτρηση και άλλων ενζύμων (ηπατικής ή άλλης προέλευσης) και της χολερυθρίνης είναι δυνατόν να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σε ορισμένες περιπτώσεις.

35. Κατά την τελευταία εβδομάδα της μελέτης μπορούν να διεξάγονται, προαιρετικά, οι ακόλουθες αναλύσεις ούρων σε ούρα που συλλέγονται σε καθορισμένο χρόνο: προσδιορισμός όψης, όγκου, ωσμωτικότητας ή ειδικού βάρους, pH, πρωτεϊνών, γλυκόζης και αίματος/αιμοκυττάρων.

([1]) Για ορισμένες μετρήσεις στον ορό και στο πλάσμα του αίματος, και ιδίως της γλυκόζης, προτιμάται να έχουν υποβληθεί τα ζώα σε ολονύκτια νηστεία. Ο κυριότερος λόγος για την προτίμηση αυτή είναι ότι η αυξημένη μεταβλητότητα, που είναι αναπόφευκτη σε περίπτωση μη υποβολής σε νηστεία, τείνει να συγκαλύπτει ορισμένες ανεπαίσθητες επιδράσεις δυσχεραίνοντας την ερμηνεία. Από την άλλη πλευρά όμως, η νηστεία αυτή μπορεί να παρεμποδίσει τον γενικό μεταβολισμό των ζώων και, ιδίως στις μελέτες διατροφής, να διαταράξει την καθημερινή έκθεση στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Σε περίπτωση επιλογής της ολονύκτιας νηστείας, οι βιοχημικές εξετάσεις πρέπει να διεξάγονται μετά τις παρατηρήσεις των λειτουργιών κατά την 4η εβδομάδα της μελέτης.

▼M4

36. Επιπλέον, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο αναζήτησης, στο πλάσμα ή στον ορό, δεικτών γενικής βλάβης των ιστών. Άλλοι προσδιορισμοί που πρέπει να διεξάγονται όταν οι γνωστές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι δυνατόν να προσβάλουν, ή υπάρχουν υπόνοιες ότι προσβάλλουν, τα μεταβολικά χαρακτηριστικά αφορούν το ασβέστιο, τα φωσφορικά άλατα, τα τριγλυκερίδια, ειδικές ορμόνες και τη χολινεστεράση. Οι προσδιορισμοί αυτοί απαιτούνται για χημικές ουσίες ορισμένων κατηγοριών ή σε συγκεκριμένες περιπτώσεις.

37. Η φύλαξη δειγμάτων πλάσματος ή ορού για τη μέτρηση των θυρεοειδικών ορμονών (T3, T4) και της θυρεοτροπίνης (προαιρετικά) ενδέχεται να αποδειχθεί χρήσιμη, αν υπάρχουν ενδείξεις επίδρασης στον άξονα υπόφυσης-θυρεοειδούς, παρά το γεγονός ότι δεν κατέστη δυνατόν να αποδειχθεί κατά τη διεθνή αξιολόγηση των σχετικών με το ενδοκρινικό σύστημα καταληκτικών σημείων αν ο προσδιορισμός των ορμονών T3, T4 και TSH παρέχει σαφές πλεονέκτημα Τα δείγματα αυτά ψύχονται στους – 20° για αποθήκευση. Οι ακόλουθοι παράγοντες ενδέχεται να επηρεάζουν τη μεταβλητότητα και τις απόλυτες τιμές συγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ορμονών:

— ο χρόνος θανάτωσης, λόγω της ημερήσιας διακύμανσης των συγκεντρώσεων ορμονών,

— η μέθοδος θανάτωσης ώστε να αποφεύγεται η πρόκληση περιττού άγχους στα ζώα που μπορεί να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις ορμονών,

— οι σειρές αντιδραστηρίων (κιτ) ορμονικού προσδιορισμού που ενδέχεται να διαφέρουν ως προς τις τυπικές καμπύλες τους.

Ο οριστικός εντοπισμός των χημικών ουσιών που δρουν στον θυρεοειδή είναι πιο αξιόπιστος όταν βασίζεται σε ιστοπαθολογική ανάλυση αντί των επιπέδων των ορμονών.

38. Τα δείγματα πλάσματος που προορίζονται ειδικά για ορμονικό προσδιορισμό θα πρέπει να λαμβάνονται σε συγκρίσιμη ώρα της ημέρας. Συνιστάται να αποφασίζεται ο προσδιορισμός των ορμονών T3, T4 και TSH με κριτήριο τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του θυρεοειδούς. Οι αριθμητικές τιμές που προκύπτουν από ανάλυση των συγκεντρώσεων ορμονών διαφέρουν ανάλογα με τα διάφορα κιτ δοκιμασιών που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο. Κατά συνέπεια, ενδέχεται να μην είναι δυνατός ο καθορισμός κριτηρίων επιδόσεων με βάση ενιαία ιστορικά δεδομένα. Εναλλακτικά, τα εργαστήρια θα πρέπει να προσπαθούν να διατηρούν τους συντελεστές μεταβλητότητας στους μάρτυρες σε επίπεδα κάτω του 25 για την T3 και την T4 και κάτω του 35 για την TSH. Όλες οι συγκεντρώσεις πρέπει να καταγράφονται σε ng/ml.

39. Εάν τα ιστορικά δεδομένα αναφοράς είναι ανεπαρκή, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο προσδιορισμού των αιματολογικών και βιοχημικών μεταβλητών πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων ή, κατά προτίμηση, σε μια ομάδα ζώων που δεν περιλαμβάνεται στις πειραματικές ομάδες.

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Νεκροψία

40. Όλα τα ζώα της μελέτης υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία/νεκροτομή η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ήπαρ, νεφρά, επινεφρίδια, όρχεις, επιδιδυμίδες, προστάτης + σπερματοδόχες κύστεις με τους πηκτικούς αδένες ως σύνολο, θύμος αδένας, σπλήνα, εγκέφαλος και καρδιά όλων των ζώων (εκτός των ετοιμοθάνατων και αυτών που θανατώνονται πριν από το τέλος της μελέτης) πρέπει να απαλλάσσονται από τους προσφυόμενους ιστούς και να ζυγίζονται για τον προσδιορισμό του υγρού βάρους, το ταχύτερο δυνατόν μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τον καθαρισμό του συμπλέγματος του προστάτη, ώστε να μην προκαλείται διάτρηση των σπερματοδόχων κύστεων που είναι πλήρεις υγρού. Εναλλακτικά, οι σπερματοδόχες κύστεις και ο προστάτης μπορούν να καθαρίζονται από ιστούς και να ζυγίζονται μετά τη μονιμοποίηση.

▼M4

41. Επιπλέον, δύο άλλοι ιστοί μπορούν να ζυγίζονται προαιρετικά, το συντομότερο δυνατόν μετά την ανατομή, ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους: το ζεύγος των ωοθηκών (υγρό βάρος) και η μήτρα, συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου [καθοδήγηση για την αφαίρεση και την προετοιμασία των ιστών της μήτρας για ζύγιση παρέχει η TG 440 του ΟΟΣΑ (18)].

42. Μετά τη μονιμοποίηση μπορεί να προσδιορίζεται (προαιρετικά) το βάρος του θυρεοειδούς. Ο καθαρισμός θα πρέπει και στην περίπτωση αυτή να πραγματοποιείται με μεγάλη προσοχή και μόνο μετά τη μονιμοποίηση, ώστε να μην προκαλείται βλάβη στους ιστούς. Οι βλάβες των ιστών μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την ιστοπαθολογική ανάλυση.

43. Οι ακόλουθοι ιστοί πρέπει να διατηρούνται στο καταλληλότερο μονιμοποιητικό υλικό, τόσο για το είδος του ιστού όσο και για την ιστοπαθολογική εξέταση για την οποία προορίζεται (βλέπε παράγραφο 47): κάθε ιστός που εμφανίζει μακροσκοπικές αλλοιώσεις, εγκέφαλος (αντιπροσωπευτικές περιοχές του κυρίου τμήματος, της παρεγκεφαλίδας και της γέφυρας), νωτιαίος μυελός, οφθαλμοί, στομάχι, λεπτό και παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων των Παϋέριων πλακών), ήπαρ, νεφρά, επινεφρίδια, σπλήνα, καρδιά, θύμος αδένας, θυρεοειδής αδένας, τραχείες και πνεύμονες (διατηρημένοι με εμφύσηση μονιμοποιητικού υλικού, ακολουθούμενη από εμβάπτιση), γεννητικοί αδένες (όρχεις και ωοθήκες), άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος της μήτρας, επιδιδυμίδες, προστάτης + σπερματοδόχες κύστεις με τους πηκτικούς αδένες), κολπική κοιλότητα, ουροδόχος κύστη, λεμφαδένες [πέραν του πλέον άμεσου αδένα αποχέτευσης, θα πρέπει να λαμβάνεται και άλλος ένας λεμφαδένας σύμφωνα με την πείρα του εργαστηρίου (15)], περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο), κατά προτίμηση ευρισκόμενο πολύ κοντά στον μυ, σκελετικός μυς και οστό με μυελό των οστών (τομή ή, εναλλακτικά, πρόσφατο παρασκεύασμα αναρροφηθέντος μυελού). Συνιστάται να μονιμοποιούνται οι όρχεις με εμβάπτιση σε μονιμοποιητικό υλικό Bouin ή τροποποιημένο μονιμοποιητικό υλικό Davidson (16) (17). Ο ινώδης χιτώνας (tunica albuginea) πρέπει να διατρυπάται με βελόνα, με ήπιες κινήσεις, σε μικρό βάθος και στα δύο άκρα ώστε να είναι δυνατή η ταχεία διείσδυση του μονιμοποιητικού υλικού. Βάσει των κλινικών και άλλων ευρημάτων, ενδέχεται να πρέπει να εξεταστούν επιπρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται.

44. Από τους ακόλουθους ιστούς είναι δυνατόν να ληφθούν πολύτιμες ενδείξεις για ενδοκρινικές επιδράσεις: γεννητικοί αδένες (όρχεις και ωοθήκες), άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος της μήτρας, επιδιδυμίδες, σπερματοδόχες κύστεις με τους πηκτικούς αδένες, ραχαιοπλάγιος και κοιλιακός λοβός προστάτη), κολπική κοιλότητα, υπόφυση, αρσενικός μαστικός αδένας, θυρεοειδής και επινεφρίδιος αδένας. Δεν έχουν τεκμηριωθεί επαρκώς οι αλλαγές στους αρσενικούς μαστικούς αδένες, αλλά η παράμετρος αυτή ενδέχεται να είναι πολύ ευαίσθητη σε ουσίες με οιστρογόνο δράση. Η παρατήρηση οργάνων/ιστών που δεν αναφέρονται στην παράγραφο 43 είναι προαιρετική (βλέπε προσάρτημα 2).

45. Το έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την ιστοπαθολογία (19) παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για την ανατομή, τη μονιμοποίηση, την τομή και την ιστολογική ανάλυση των ενδοκρινικών ιστών.

46. Από το διεθνές πρόγραμμα δοκιμών προέκυψαν ορισμένα αποδεικτικά στοιχεία, σύμφωνα με τα οποία ανεπαίσθητες ενδοκρινικές επιδράσεις χημικών ουσιών με μικρή ικανότητα προσβολής της ομοιόστασης των σεξουαλικών ορμονών είναι δυνατόν να εντοπιστούν μέσω της διαταραχής του συγχρονισμού του κύκλου του οίστρου σε διάφορους ιστούς και, σε μικρότερο βαθμό, μέσω εμφανών ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων στα θηλυκά αναπαραγωγικά όργανα. Παρά την απουσία ακλόνητων αποδείξεων των επιδράσεων αυτών, συνιστάται να λαμβάνονται υπόψη τα στοιχεία πιθανής ασυγχρονίας του κύκλου του οίστρου κατά την ερμηνεία της ιστοπαθολογίας των ωοθηκών (κύτταρα του θυλακίου, της θήκης και των κοκκίων), της μήτρας, του τραχήλου και του κόλπου. Στη σύγκριση αυτή θα μπορούσε να συμπεριληφθεί, εφόσον αξιολογείται, και το στάδιο του κύκλου που προσδιορίζεται με κολπικά επιχρίσματα.

▼M4

Ιστοπαθολογία

47. Τα διατηρημένα όργανα και ιστοί όλων των ζώων των ομάδων-μαρτύρων και των ομάδων υψηλής δόσης πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη ιστοπαθολογική εξέταση. Σε περίπτωση που παρατηρηθούν αλλοιώσεις συνδεόμενες με την αγωγή στην ομάδα υψηλής δόσης, η εξέταση πρέπει να επεκτείνεται και στα ζώα των ομάδων που έλαβαν όλες τις υπόλοιπες δόσεις.

48. Εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις.

49. Σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί δορυφορική ομάδα, υποβάλλονται σε ιστοπαθολογική εξέταση οι ιστοί και τα όργανα που διαπιστώθηκε ότι παρουσίασαν επιδράσεις στις ομάδες αγωγής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

50. Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα αγωγής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν και τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν εκδηλώσεις τοξικότητας, περιγραφή των παρατηρηθέντων συμπτωμάτων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων του χρόνου εμφάνισης, της διάρκειας και της σοβαρότητάς τους, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν αλλοιώσεις, τον τύπο και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων, καθώς και το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν καθέναν από τους τύπους αλλοιώσεων.

51. Όταν είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με τη βοήθεια κατάλληλης στατιστικής μεθόδου γενικής αποδοχής. Με τη σύγκριση των επιδράσεων σε ένα εύρος δόσεων αποφεύγεται η χρήση πολλών δοκιμών t. Οι στατιστικές μέθοδοι πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης.

52. Για τον ποιοτικό έλεγχο προτείνεται η συλλογή ιστορικών δεδομένων ως μάρτυρα και ο υπολογισμός συντελεστών μεταβλητότητας για τα αριθμητικά δεδομένα, ιδίως όσον αφορά τις παραμέτρους που συνδέονται με την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιούνται για συγκρίσεις κατά την αξιολόγηση πραγματικών μελετών.

Έκθεση δοκιμής

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

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικές ιδιότητες,

— στοιχεία ταυτότητας.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν πρόκειται για νερό.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή χρησιμοποιηθέντων ζώων,

— αριθμός ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφή κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής,

— αιτιολόγηση της επιλογής άλλου είδους εκτός από τον επίμυ.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της επιλογής του επιπέδου δόσης,

— λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/τροφής, επιτευχθείσα συγκέντρωση, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

▼**M4**

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— κατά περίπτωση, μετατροπή της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο ή το πόσιμο νερό (ppm) σε πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα),

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Προαιρετικά καταληκτικά σημεία που διερευνήθηκαν

— κατάλογος των προαιρετικών καταληκτικών σημείων που διερευνήθηκαν.

Αποτελέσματα:

— βάρος σώματος/μεταβολές του βάρους σώματος,

— κατά περίπτωση, κατανάλωση τροφής και νερού,

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης κατά φύλο και επίπεδο δόσης, συμπεριλαμβανομένων των τοξικών εκδηλώσεων,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων και μη),

— αξιολόγηση των αισθητηρίων λειτουργιών, της δύναμης της λαβής και της κινητικότητας,

— αιματολογικές εξετάσεις με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς,

— βιοχημικές εξετάσεις με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς,

— βάρος σώματος κατά την ευθανασία και βάρος των οργάνων,

— ευρήματα νεκροψίας,

— αναλυτική περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— δεδομένα για την απορρόφηση, εφόσον διατίθενται,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εφόσον κρίνεται σκόπιμο.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

▼M4

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

NOAEL είναι η συντομογραφία του όρου “no observed adverse effect level”. Πρόκειται για το ανώτατο επίπεδο δόσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις σχετιζόμενες με την αγωγή.

Ανδρογονικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική ανδρογόνος ορμόνη (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Αντιανδρογονικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής ανδρογόνου ορμόνης (π.χ. τεστοστερόνη) στον οργανισμό ενός θηλαστικού.

Αντιθυρεοειδική δράστικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής θυρεοειδικής ορμόνης (π.χ. T_3) στον οργανισμό ενός θηλαστικού.

Αντιοιστρογονικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής οιστρογόνου ορμόνης (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Δόση είναι η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος ελεγχόμενης χημικής ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου ανά ημέρα (π.χ. mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) ή σε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή.

Δοσολογία είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, καθώς και τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησής της.

Έκδηλη τοξικότητα είναι ένας γενικός όρος που δηλώνει σαφή σημεία τοξικότητας μετά από χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Αυτά πρέπει να επαρκούν για την εκτίμηση του κινδύνου και να είναι τέτοια ώστε η αύξηση της χορηγούμενης δόσης να αναμένεται ότι θα προκαλέσει σοβαρές τοξικές εκδηλώσεις και πιθανώς θνησιμότητα.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Επικύρωση είναι μια επιστημονική διαδικασία σχεδιασμένη για τον χαρακτηρισμό των λειτουργικών απαιτήσεων και περιορισμών των μεθόδων δοκιμών και την απόδειξη της αξιοπιστίας και της καταλληλότητάς τους για συγκεκριμένο σκοπό.

Θυρεοειδική δραστικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική θυρεοειδική ορμόνη (π.χ. T_3) στον οργανισμό θηλαστικού.

Οιστρογονικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική οιστρογόνος ορμόνη (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

▼M4

Προσάρτημα 2

Συνιστώμενα καταληκτικά σημεία για την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών στην παρούσα μέθοδο δοκιμών B.7

Υποχρεωτικά καταληκτικά σημεία	Προαιρετικά καταληκτικά σημεία
Βάρος	
— Όρχεις — Επιδιδυμίδες — Επινεφρίδια — Προστάτης + σπερματοδόχες κύστες με τους πηκτικούς αδένες	— Ωοθήκες — Μήτρα, συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου της — Θυρεοειδής
Ιστοπαθολογία	
— Γεννητικοί αδένες: — όρχεις και — ωοθήκες — Άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος: — επιδιδυμίδες, — προστάτης + σπερματοδόχες κύστεις με τους πηκτικούς αδένες, — μήτρα, συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου της — Επινεφρίδια — Θυρεοειδής — Κόλπος	— Κολπικά επιχρίσματα — Αρσενικοί μαστικοί αδένες — Υπόφυση
Μέτρηση ορμονών	
	— Κυκλοφορούντα επίπεδα T3, T4 — Κυκλοφορούντα επίπεδα TSH

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼**M4**

(7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11 March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

(12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

Β.8. ΥΠΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ 28 ΗΜΕΡΩΝ

ΣΥΝΟΨΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.8 έχει σχεδιαστεί για τον πλήρη χαρακτηρισμό της τοξικότητας ελεγχόμενων χημικών ουσιών που χορηγούνται μέσω της αναπνευστικής οδού, μετά από επανειλημμένη έκθεση για περιορισμένη χρονική περίοδο (28 ημέρες), καθώς και για την παροχή δεδομένων για ποσοτικές εκτιμήσεις των αναπνευστικών κινδύνων. Ομάδες τουλάχιστον 5 αρσενικών και 5 θηλυκών τρωκτικών εκτίθενται για 6 ώρες ημερησίως επί 28 ημέρες α) στην ελεγχόμενη χημική ουσία, σε τρία ή περισσότερα επίπεδα συγκέντρωσης, β) σε φιλτραρισμένο αέρα (αρνητικός μάρτυρας) και/ή γ) στον φορέα (μάρτυρας για τον φορέα). Τα ζώα εκτίθενται γενικά επί 5 ημέρες ανά εβδομάδα, αλλά επιτρέπεται επίσης η έκθεση επί 7 ημέρες ανά εβδομάδα. Στη δοκιμή υποβάλλονται πάντα αρσενικά και θηλυκά ζώα, αλλά μπορούν να εκτίθενται σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, εάν είναι γνωστό ότι ένα φύλο είναι πιο ευαίσθητο σε δεδομένη ελεγχόμενη χημική ουσία. Η παρούσα μέθοδος παρέχει στον διευθυντή της μελέτης την ευελιξία να συμπεριλαμβάνει στη μελέτη δορυφορικές ομάδες (αναστρεψιμότητας), βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), νευρολογικές εξετάσεις και πρόσθετες εκτιμήσεις κλινικής παθολογίας και ιστοπαθολογίας, με σκοπό τον ακριβέστερο χαρακτηρισμό της τοξικότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 412 του ΟΟΣΑ (2009). Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 412 (TG 412) για την υποξεία αναπνευστική τοξικότητα εκδόθηκε το 1981 (1). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.8 (ισοδύναμη με την αναθεωρημένη TG 412) έχει επικαιροποιηθεί ώστε να αντανακλά την πρόοδο της επιστήμης και να ανταποκρίνεται στις τρέχουσες και τις μελλοντικές κανονιστικές ανάγκες.

2. Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον χαρακτηρισμό των δυσμενών επιδράσεων που προκαλούνται από επανειλημμένη καθημερινή αναπνευστική έκθεση σε μια ελεγχόμενη χημική ουσία για 28 ημέρες. Τα δεδομένα που προκύπτουν από μελέτες υποξείας αναπνευστικής τοξικότητας 28 ημερών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποσοτικές εκτιμήσεις κινδύνων [εάν δεν ακολουθήσει μελέτη υποχρόνιας αναπνευστικής τοξικότητας 90 ημερών (κεφάλαιο Β.29 του παρόντος παραρτήματος)]. Τα δεδομένα παρέχουν επίσης πληροφορίες σχετικά με την επιλογή συγκεντρώσεων για πιο μακροπρόθεσμες μελέτες, όπως η μελέτη υποχρόνιας αναπνευστικής τοξικότητας 90 ημερών. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν προορίζεται ειδικά για τον έλεγχο νανοϋλικών. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρατίθενται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο καθοδήγησης GD 39 (2).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

3. Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης το εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία, ώστε να βελτιώνεται η ποιότητα της μελέτης και να ελαχιστοποιείται η χρήση ζώων. Πληροφορίες που βοηθούν στην επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας in vitro ή in vivo, οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου, τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR και τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς ουσίες και τα δεδομένα που προέρχονται από δοκιμές οξείας αναπνευστικής τοξικότητας. Εάν αναμένεται ή παρατηρείται κατά τη διάρκεια της μελέτης νευροτοξικότητα, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να συμπεριλάβει κατάλληλες αξιολογήσεις, όπως δέσμη παρατηρήσεων λειτουργιών (functional observational battery — FOB) και μέτρηση της κινητικής δραστηριότητας. Αν και το χρονοδιάγραμμα της έκθεσης που σχετίζεται με ειδικές εξετάσεις ενδέχεται να είναι κρίσιμης σημασίας, η εκτέλεση αυτών των πρόσθετων δραστηριοτήτων δεν θα πρέπει να περισπά τον σχεδιασμό της κυρίως μελέτης.

▼M4

4. Διαλύματα διαβρωτικών ή ερεθιστικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών μπορούν να υποβάλλονται στη δοκιμή σε συγκεντρώσεις που να έχουν ως αποτέλεσμα τον επιθυμητό βαθμό τοξικότητας [βλέπε έγγραφο GD 39 (2)]. Κατά την έκθεση ζώων σε αυτά τα υλικά, οι συγκεντρώσεις στόχου θα πρέπει να τόσο χαμηλές ώστε να μην προκαλούν έντονο πόνο και δυσφορία, αλλά να αρκούν για την επέκταση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης σε επίπεδα που επιτυγχάνουν τους κανονιστικούς και επιστημονικούς στόχους της δοκιμής. Οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να επιλέγονται ανάλογα με την περίπτωση, κατά προτίμηση βάσει καταλλήλως σχεδιασμένης μελέτης καθορισμού εύρους που επιτρέπει τη λήψη πληροφοριών σχετικά με το κρίσιμο καταληκτικό σημείο, τυχόν όριο ερεθισμού και τον χρόνο εμφάνισης των εκδηλώσεων (βλέπε παραγράφους 11-13). Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή των συγκεντρώσεων.

5. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν έντονο πόνο ή έντονη και διαρκή δυσφορία, πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία. Τα ετοιμοθάνατα ζώα αντιμετωπίζονται όπως εκείνα που πεθαίνουν κατά τη δοκιμή. Τα κριτήρια για τη λήψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και κατευθύνσεις για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικείμενου θανάτου, αποτελούν το αντικείμενο εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (3).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

6. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά, ενήλικα τρωκτικά των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Το προτιμώμενο είδος είναι ο επίμυς. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση.

Προετοιμασία των ζώων

7. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Κατά την ημέρα τυχαιοποίησης, τα ζώα πρέπει να είναι νεαρά ενήλικα, ηλικίας 7 έως 9 εβδομάδων. Η διακύμανσης των βαρών σώματος πρέπει να είναι ± 20 % του μέσου βάρους των ζώων κάθε φύλου. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαδεύονται για να μπορούν να αναγνωριστούν και παραμένουν στους κλωβούς τους επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου.

Ζωοτεχνία

8. Κάθε ζώο πρέπει να ταυτοποιείται, εάν είναι δυνατόν με υποδόριο αναμεταδότη, ώστε να διευκολύνεται η παρατήρηση και να μη δημιουργείται σύγχυση. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται, σε ιδανικές συνθήκες, εντός ενός εύρους 30 έως 70 %, αν και αυτό ενδέχεται να μην είναι δυνατό όταν χρησιμοποιείται το νερό ως φορέας. Πριν και μετά την έκθεση, τα ζώα πρέπει γενικά να στεγάζονται σε κλωβούς σε ομάδες ανά φύλο και συγκέντρωση, αλλά ο αριθμός των ζώων ανά κλωβό πρέπει να μην εμποδίζει την παρατήρηση κάθε ζώου και να ελαχιστοποιεί τις απώλειες λόγω κανιβαλισμού ή μαχών. Όταν τα ζώα πρόκειται να εκτεθούν μόνο ρινικά, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να εγκλιματιστούν στους σωλήνες συγκράτησης. Οι σωλήνες συγκράτησης δεν θα πρέπει να προκαλούν στα ζώα περιττή φυσική ή θερμική δυσφορία ή δυσφορία λόγω ακινητοποίησης. Η συγκράτηση ενδέχεται να επηρεάζει τα φυσικά καταληκτικά σημεία, όπως τη θερμοκρασία του σώματος (υπερθερμία) και/ή τον όγκο του αναπνεόμενου αέρα ανά λεπτό. Εάν υπάρχουν γενικά δεδομένα που δείχνουν ότι δεν προκαλούνται τέτοιες αλλαγές σε σημαντικό βαθμό, δεν είναι απαραίτητη η εκ των προτέρων προσαρμογή στους σωλήνες συγκράτησης. Τα ζώα που εκτίθενται ολόσωμα σε αερόλυμα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά κατά τη διάρκεια της έκθεσης, ώστε να αποφεύγεται η διήθηση του ελεγχόμενου αερολύματος μέσω του τριχώματος των ζώων που στεγάζονται στον ίδιο κλωβό. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά και πιστοποιημένα εργαστηριακά σιτηρέσια, εκτός από την περίοδο της έκθεσης, συνοδευόμενα από απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού από το δίκτυο ύδρευσης. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών.

▼M4

Θάλαμοι εισπνοής

9. Κατά την επιλογή θαλάμου εισπνοής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η φύση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και ο στόχος της δοκιμής. Προτιμώμενος τρόπος έκθεσης είναι η ρινική έκθεση (ο όρος περιλαμβάνει την κεφαλική, τη ρινική και τη ρυγχική έκθεση). Η ρινική έκθεση προτιμάται γενικά για μελέτες με υγρά ή στερεά αερολύματα και για ατμούς που είναι δυνατόν να συμπυκνωθούν σχηματίζοντας αερολύματα. Ειδικοί στόχοι της μελέτης ενδέχεται να επιτυγχάνονται καλύτερα με την εφαρμογή ολόσωμης έκθεσης, αλλά αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται στην έκθεση της μελέτης. Για να εξασφαλίζεται η σταθερότητα της ατμόσφαιρας κατά τη χρήση θαλάμου ολόσωμης έκθεσης, ο συνολικός «όγκος» των πειραματόζωων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του θαλάμου. Οι αρχές των τεχνικών ρινικής και ολόσωμης έκθεσης, καθώς και τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους, εξετάζονται στο έγγραφο GD 39 (2).

ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οριακές συγκεντρώσεις

10. Σε αντίθεση με τις μελέτες οξείας τοξικότητας, δεν υπάρχουν καθορισμένες οριακές συγκεντρώσεις στις μελέτες υποξείας αναπνευστικής τοξικότητας 28 ημερών. Η μέγιστη ελεγχόμενη συγκέντρωση θα πρέπει να εξαρτάται από 1) τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση, 2) το επίπεδο έκθεσης του ανθρώπου στη χειρότερη περίπτωση, 3) την ανάγκη διατήρησης επαρκούς παροχής οξυγόνου και/ή 4) ζητήματα καλής μεταχείρισης των ζώων. Εάν δεν υπάρχουν όρια βάσει δεδομένων, μπορούν να χρησιμοποιούνται τα όρια οξείας τοξικότητας του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (13) (ήτοι, μέγιστη συγκέντρωση 5 mg/l για αερολύματα, 20 mg/l για ατμούς και 20 000 ppm για αέρια)· βλέπε έγγραφο GD 39 (2). Τυχόν αναγκαία υπέρβαση των ορίων αυτών κατά τις δοκιμές με αέρια ή ιδιαιτέρως πτητικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες (π.χ. ψυκτικά μέσα) θα πρέπει να αιτιολογείται. Η οριακή συγκέντρωση θα πρέπει να προκαλεί την εκδήλωση αδιαμφισβήτητης τοξικότητας, χωρίς περιττό άγχος για τα ζώα και χωρίς επίδραση στη μακροζωία τους (3).

Μελέτη καθορισμού εύρους

11. Πριν από την έναρξη της κυρίως μελέτης, ενδέχεται να πρέπει να εκπονηθεί μελέτη καθορισμού εύρους. Η μελέτη καθορισμού εύρους είναι πιο εκτενής από την αναγνωριστική μελέτη διότι δεν περιορίζεται στην επιλογή συγκεντρώσεων. Οι γνώσεις που αποκτώνται από τη μελέτη καθορισμού εύρους μπορούν να οδηγήσουν στην επιτυχία της κυρίως μελέτης. Μια μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί, παραδείγματος χάριν, να παρέχει τεχνικές πληροφορίες σχετικά με αναλυτικές μεθόδους, την κατανομή μεγέθους σωματιδίων, την ανακάλυψη τοξικών μηχανισμών, δεδομένα κλινικής παθολογίας και ιστοπαθολογίας, και εκτιμήσεις των συγκεντρώσεων NOAEL και MTC στην κυρίως μελέτη. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει τη μελέτη καθορισμού εύρους για να προσδιορίσει το όριο ερεθισμού της αναπνευστικής οδού (π.χ. μέσω ιστολογικής ανάλυσης της αναπνευστικής οδού, τεστ λειτουργίας των πνευμόνων ή βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος), την ανώτερη συγκέντρωση που είναι ανεκτή χωρίς να προκαλείται περιττό άγχος στα ζώα και τις παραμέτρους που χαρακτηρίζουν με τον καλύτερο τρόπο την τοξικότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

12. Η μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί να περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα επίπεδα συγκέντρωσης. Δεν θα πρέπει να εκτίθενται περισσότερα από τρία αρσενικά και τρία θηλυκά ζώα σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Η μελέτη καθορισμού εύρους θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 5 μέρες και γενικά έως 14 ημέρες. Στην έκθεση της μελέτης θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή συγκεντρώσεων για την κυρίως μελέτη. Στόχος της κυρίως μελέτης είναι να καταδειχθεί η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης βάσει των προβλέψεων σχετικά με το πλέον ευαίσθητο καταληκτικό σημείο. Η χαμηλή συγκέντρωση θα πρέπει, σε ιδανικές συνθήκες, να είναι η συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις, ενώ η υψηλή συγκέντρωση θα πρέπει να προκαλεί την εκδήλωση αδιαμφισβήτητης τοξικότητας, χωρίς περιττό άγχος για τα ζώα και χωρίς επίδραση στη μακροζωία τους (3).

▼M4

13. Κατά την επιλογή επιπέδων συγκέντρωσης για τη μελέτη καθορισμού εύρους, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων των σχέσεων δομής-δράσης και των δεδομένων που αφορούν παρόμοιες χημικές ουσίες (βλέπε παράγραφο 3). Η μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί να επαληθεύσει/διαψεύσει τα θεωρούμενα ως πλέον ευαίσθητα από μηχανιστικής πλευράς καταληκτικά σημεία, π.χ. αναστολή της χολινεστεράσης από οργανοφωσφορικές ενώσεις, σχηματισμός μεθαιμοσφαιρίνης από ερυθροκυτταροτοξικούς παράγοντες, θυρεοειδικές ορμόνες (T_3, T_4), προκειμένου για θυρεοτοξικές ουσίες, πρωτεΐνες, LDH ή ουδετερόφυλα σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, προκειμένου για αβλαβή δυσδιάλυτα σωματίδια ή ερεθιστικά για τους πνεύμονες αερολύματα.

Κυρίως μελέτη

14. Η κυρίως μελέτη υποξείας τοξικότητας περιλαμβάνει γενικά τρία επίπεδα συγκέντρωσης και, επίσης, παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες (αέρας) και/ή μάρτυρες για τον φορέα, κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφο 17). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται όλα τα διαθέσιμα δεδομένα για τη διευκόλυνση της επιλογής κατάλληλων επιπέδων έκθεσης, συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων μελετών συστημικής τοξικότητας, του μεταβολισμού και της κινητικής (ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δίνεται στην αποφυγή υψηλών επιπέδων συγκέντρωσης που προκαλούν κορεσμό των κινητικών διαδικασιών). Κάθε ομάδα δοκιμής περιλαμβάνει τουλάχιστον 10 τρωκτικά (5 αρσενικά και 5 θηλυκά), τα οποία εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία για 6 ώρες ημερησίως επί 5 ημέρες ανά εβδομάδα, για περίοδο 4 εβδομάδων (η συνολική διάρκεια της μελέτης είναι 28 ημέρες). Τα ζώα μπορούν επίσης να εκτίθενται επί 7 ημέρες ανά εβδομάδα (π.χ. κατά τις δοκιμές με εισπνεόμενα φαρμακευτικά προϊόντα). Εάν είναι γνωστό ότι ένα φύλο είναι περισσότερο ευαίσθητο σε δεδομένη ελεγχόμενη χημική ουσία, τα δύο φύλα μπορούν να εκτίθενται σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, ώστε να βελτιστοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 15. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Εάν η διάρκεια έκθεσης είναι μικρότερη των 6 ωρών/ημέρα ή όταν είναι απαραίτητο να διεξαχθεί μελέτη μακρόχρονης ολόσωμης έκθεσης (π.χ. 22 ώρες/ημέρα), θα πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση [βλέπε έγγραφο GD 39 (2)]. Κατά την περίοδο έκθεσης τα ζώα θα πρέπει να στερούνται τροφής, εκτός εάν η έκθεση υπερβαίνει τις 6 ώρες. Νερό μπορεί να παρέχεται καθ' όλη τη διάρκεια της ολόσωμης έκθεσης.

15. Οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις στόχου θα πρέπει να εντοπίζουν τα όργανα-στόχους και να καταδεικνύουν σαφή σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης:

— Το υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να έχει τοξικές επιδράσεις αλλά να μην προκαλεί παρατεταμένες εκδηλώσεις τοξικότητας ή θανάτους, που θα καθιστούσαν άσκοπη την αξιολόγηση.

— Τα ενδιάμεσα επίπεδα συγκέντρωσης θα πρέπει να απέχουν χρονικά έτσι ώστε να επιτυγχάνεται διαβάθμιση των τοξικών επιδράσεων ανάμεσα στη χαμηλή και την υψηλή συγκέντρωση.

— Το χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να προκαλεί ελάχιστες ή μηδενικές ενδείξεις τοξικότητας.

Δορυφορική μελέτη (αναστρεψιμότητας)

16. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί δορυφορική μελέτη (αναστρεψιμότητας) με σκοπό την παρατήρηση της αναστρεψιμότητας, της εμμονής ή της καθυστερημένης εμφάνισης τοξικότητας για κατάλληλο χρονικό διάστημα μετά την αγωγή, τουλάχιστον όμως επί 14 ημέρες. Οι δορυφορικές ομάδες (αναστρεψιμότητας) αποτελούνται από πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά ζώα που εκτίθενται ταυτόχρονα με τα πειραματόζωα της κυρίως μελέτης. Οι ομάδες της δορυφορικής μελέτης (αναστρεψιμότητας) θα πρέπει να εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία στο υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης, ενώ θα πρέπει να υπάρχουν και παράλληλοι μάρτυρες για τον αέρα και/ή τον φορέα, κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφο 17).

▼M4

Ζώα-μάρτυρες

17. Τα ζώα που χρησιμοποιούνται ως παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες (αέρας) θα πρέπει να υφίστανται την ίδια μεταχείριση με τα ζώα των ομάδων δοκιμής, με τη μόνη διαφορά ότι τα πρώτα εκτίθενται σε φιλτραρισμένο αέρα και όχι στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Όταν χρησιμοποιείται νερό ή άλλη ουσία για να υποβοηθήσει τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στη μελέτη ομάδα-μάρτυρας για τον φορέα αντί της ομάδας αρνητικού μάρτυρα (αέρας). Ως φορέας θα πρέπει να χρησιμοποιείται το νερό, εφόσον είναι δυνατόν. Όταν χρησιμοποιείται νερό ως φορέας, τα ζώα-μάρτυρες θα πρέπει να εκτίθενται σε αέρα με την ίδια σχετική υγρασία όπως οι ομάδες έκθεσης. Η επιλογή κατάλληλου φορέα θα πρέπει να βασίζεται σε καταλλήλως διεξαχθείσα προκαταρκτική μελέτη ή σε ιστορικά δεδομένα. Εάν δεν είναι αρκούντως γνωστή η τοξικότητα του φορέα, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει και αρνητικούς μάρτυρες (αέρας) και μάρτυρες για τον φορέα, αλλά αυτό δεν συνιστάται. Εάν, βάσει ιστορικών δεδομένων, ο φορέας δεν είναι τοξικός, δεν χρειάζεται ομάδα αρνητικού μάρτυρα (αέρας) αλλά μόνο ομάδα-μάρτυρας για τον φορέα. Εάν η προκαταρκτική μελέτη μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που έχει μορφοποιηθεί σε φορέα δεν αποκαλύψει τοξικότητα, θεωρείται ότι ο φορέας δεν είναι τοξικός στην ελεγχθείσα συγκέντρωση, οπότε θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μάρτυρας για τον συγκεκριμένο φορέα.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χορήγηση των συγκεντρώσεων

18. Τα ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία σε μορφή αερίου, ατμών, αερολύματος ή μείγματος αυτών. Η φυσική κατάσταση που ελέγχεται εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, την επιλεχθείσα συγκέντρωση και/ή τη φυσική μορφή που είναι πιθανότερο να υπάρχει κατά τον χειρισμό και τη χρήση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Υγροσκοπικές και χημικά δραστικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή υπό συνθήκες ξηρού αέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην παράγονται εκρηκτικές συγκεντρώσεις. Τα σωματιδιακά υλικά μπορούν να υποβάλλονται σε μηχανικές διεργασίες ώστε να μειώνεται το μέγεθος των σωματιδίων. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

19. Πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων για όλα τα αερολύματα και για ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνωθούν σχηματίζοντας αερολύματα. Για να είναι δυνατή η έκθεση όλων των σχετικών περιοχών της αναπνευστικής οδού, συνιστώνται αερολύματα με διάμεσο αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) 1 έως 3 μm, με γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g) 1,5 έως 3,0 (4). Παρόλο που θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για τη συμμόρφωση με το πρότυπο αυτό, εάν αυτό δεν είναι δυνατόν θα πρέπει να αναφέρεται η γνώμη των ειδικών. Παραδείγματος χάριν, σωματίδια καπνών μετάλλων μπορεί να υπολείπονται του προτύπου αυτού, ενώ φορτισμένα σωματίδια και ίνες μπορεί να το υπερβαίνουν.

Παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε φορέα

20. Σε ιδανικές συνθήκες, η ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή χωρίς φορέα. Εάν είναι απαραίτητη η χρήση φορέα για την επίτευξη κατάλληλης συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και κατάλληλου μεγέθους σωματιδίων, θα πρέπει να προτιμάται το νερό. Κάθε φορά που μια ελεγχόμενη χημική ουσία διαλύεται σε φορέα, πρέπει να καταδεικνύεται η σταθερότητά της.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΘΕΣΗΣ

Ροή αέρα στον θάλαμο

21. Η ροή του αέρα μέσω του θαλάμου έκθεσης πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται τουλάχιστον σε ωριαία βάση κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης. Η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της συγκέντρωσης στην πειραματική ατμόσφαιρα (ή της χρονικής σταθερότητας) είναι ολοκληρωτική μέτρηση όλων των δυναμικών

▼M4

παραμέτρων και αποτελεί έμμεσο τρόπο ελέγχου όλων των σχετικών δυναμικών αναπνευστικών παραμέτρων. Εάν η συγκέντρωση παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο, η συχνότητα μέτρησης των ροών αέρα μπορεί να μειωθεί σε μία μόνο μέτρηση ανά έκθεση ανά ημέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται ειδική μέριμνα για την αποφυγή της εκ νέου αναπνοής στους θαλάμους ρινικής έκθεσης. Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 19 % και η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα να μην υπερβαίνει το 1 %. Εάν υπάρχει λόγος να θεωρείται ότι δεν μπορεί να τηρηθεί το πρότυπο αυτό, πρέπει να μετρώνται οι συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Εάν οι μετρήσεις κατά την πρώτη ημέρα έκθεσης δείχνουν ότι τα αέρια αυτά βρίσκονται σε κατάλληλα επίπεδα, δεν είναι απαραίτητο να εκτελούνται περαιτέρω μετρήσεις.

Θερμοκρασία και σχετική υγρασία του θαλάμου

22. Η θερμοκρασία του θαλάμου πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία στη ζώνη αναπνοής των ζώων, τόσο στη ρινική όσο και στην ολόσωμη έκθεση, θα πρέπει να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται ανά ώρα κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης, εφόσον είναι δυνατόν. Η σχετική υγρασία θα πρέπει κατά προτίμηση να διατηρείται σε επίπεδα 30 έως 70 %, αλλά αυτό μπορεί να είναι είτε ανέφικτο (π.χ. κατά τη δοκιμή μειγμάτων που έχουν ως βάση το νερό) ή μη μετρήσιμο, λόγω αλληλεπίδρασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με τη μέθοδο δοκιμών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: ονομαστική συγκέντρωση

23. Εάν είναι εφικτό, θα πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται η ονομαστική συγκέντρωση στον θάλαμο έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση ορίζεται ως η μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του συστήματος του θαλάμου εισπνοής. Η ονομαστική συγκέντρωση δεν χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης των ζώων, αλλά η σύγκρισή της με την πραγματική συγκέντρωση παρέχει ένδειξη για την απόδοση παραγωγής του συστήματος δοκιμών και, συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό προβλημάτων παραγωγής.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: πραγματική συγκέντρωση

24. Η πραγματική συγκέντρωση ορίζεται ως η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε δείγμα που λαμβάνεται από τη ζώνη αναπνοής των ζώων σε θάλαμο εισπνοής. Οι πραγματικές συγκεντρώσεις μπορούν να ληφθούν είτε με ειδικές μεθόδους (π.χ. άμεση δειγματοληψία, μέθοδοι προσρόφησης ή χημικής αντίδρασης και επακόλουθος αναλυτικός χαρακτηρισμός) είτε με μη ειδικές μεθόδους, όπως η σταθμική ανάλυση με ηθμό. Η χρήση σταθμικής ανάλυσης είναι αποδεκτή μόνο για αερολύματα σκόνης ενός μέρους ή για αερολύματα υγρών χαμηλής πτητικότητας και θα πρέπει να υποστηρίζεται από κατάλληλους χαρακτηρισμούς της ελεγχόμενης ουσίας πριν από τη μελέτη. Η συγκέντρωση αερολυμάτων σκόνης πολλών μερών μπορεί επίσης να προσδιοριστεί με σταθμική ανάλυση. Ωστόσο, απαιτούνται εν προκειμένω αναλυτικά δεδομένα που να καταδεικνύουν ότι η σύνθεση του αερομεταφερόμενου υλικού είναι παρόμοια με εκείνη του αρχικού υλικού. Εάν οι πληροφορίες αυτές δεν είναι διαθέσιμες, ενδέχεται να απαιτείται εκ νέου ανάλυση της ελεγχόμενης ουσίας (ιδανικά, στην αερομεταφερόμενη κατάσταση) ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Για ουσίες σε μορφή αερολύματος που είναι δυνατόν να εξατμιστούν ή να εξαχνωθούν, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι συλλέγονται όλες οι φάσεις με την επιλεγείσα μέθοδο.

25. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία παρτίδα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, εάν είναι δυνατόν, και το δοκίμιο να αποθηκεύεται υπό συνθήκες που διατηρούν την καθαρότητα, την ομοιογένεια και τη σταθερότητά του. Πριν από την έναρξη της μελέτης, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να χαρακτηρίζεται, μεταξύ άλλων ως προς την καθαρότητά της και, εάν είναι τεχνικά εφικτό, ως προς την ταυτότητα και τις ποσότητες των ταυτοποιημένων ρύπων και προσμείξεων. Αυτό μπορεί να καταδειχθεί, μεταξύ άλλων, από τα ακόλουθα δεδομένα: χρόνος κατακράτησης και εμβαδόν της σχετικής κορυφής, μοριακό βάρος μέσω αναλύσεων φασματομετρίας μάζας ή αεριοχρωματογραφίας ή άλλες εκτιμήσεις. Παρόλο που η ταυτότητα του ελεγχόμενου δείγματος δεν αποτελεί ευθύνη του εργαστηρίου, θα ήταν σκόπιμο να επιβεβαιώνει το εργαστήριο, έστω και σε περιορισμένο βαθμό, τον χαρακτηρισμό από τον χορηγό (π.χ. χρώμα, φυσική κατάσταση κ.λπ.).

▼M4

26. Η ατμόσφαιρα έκθεσης θα πρέπει να διατηρείται κατά το δυνατόν σταθερή. Μπορεί να χρησιμοποιείται συσκευή παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο, όπως φωτόμετρο αερολυμάτων για τα αερολύματα ή αναλυτής ολικών υδρογονανθράκων για τους ατμούς, προκειμένου να καταδεικνύεται η σταθερότητα των συνθηκών έκθεσης. Η πραγματική συγκέντρωση στον θάλαμο θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον 3 φορές κατά τη διάρκεια κάθε ημέρας έκθεσης σε κάθε επίπεδο έκθεσης. Εάν δεν είναι εφικτό λόγω περιορισμένης ταχύτητας ροής του αέρα ή χαμηλών συγκεντρώσεων, είναι αποδεκτή η λήψη ενός δείγματος ανά περίοδο έκθεσης. Σε ιδανικές συνθήκες, το δείγμα αυτό θα πρέπει να συλλέγεται καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Τα επιμέρους δείγματα συγκέντρωσης στον θάλαμο δεν θα πρέπει να αποκλίνουν από τη μέση συγκέντρωση του θαλάμου περισσότερο από ± 10 %, προκειμένου για αέρια και ατμούς, και ± 20 % προκειμένου για υγρά ή στερεά αερολύματα. Πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται ο χρόνος εξισορρόπησης του θαλάμου (t_{95}). Η διάρκεια μιας έκθεσης καλύπτει τον χρόνο παραγωγής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, στον οποίο λαμβάνονται υπόψη οι χρόνοι που απαιτούνται για την εξισορρόπηση του θαλάμου (t_{95}) και τη διάσπαση. Καθοδήγηση για την εκτίμηση του t_{95} παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

27. Στην περίπτωση πολύ σύνθετων μειγμάτων, αποτελούμενων από αέρια/ατμούς και αερολύματα (π.χ. ατμόσφαιρες καύσης και ελεγχόμενες χημικές ουσίες εξωθούμενες από στοχοστρεφή προϊόντα/συσκευές τελικής χρήσης), κάθε φάση ενδέχεται να συμπεριφέρεται διαφορετικά σε θάλαμο εισπνοής. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να επιλέγεται τουλάχιστον μία ουσία-δείκτης (αναλύτης), συνήθως η κύρια δραστική ουσία του μείγματος, από κάθε φάση (αέριο/ατμοί και αερόλυμα). Όταν η ελεγχόμενη ουσία είναι μείγμα, η αναλυτική συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται για ολόκληρο το μείγμα και όχι μόνο για το δραστικό συστατικό ή την ουσία-δείκτη (αναλύτης). Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις πραγματικές συγκεντρώσεις παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (2).

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κατανομή μεγέθους σωματιδίων

28. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων των αερολυμάτων τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, με τη χρήση κρουστικού διαχωριστήρα ή εναλλακτικού οργάνου, όπως ο αεροδυναμικός κατανεμητής σωματιδίων (APS). Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με κρουστικό διαχωριστήρα και με το εναλλακτικό όργανο, επιτρέπεται να χρησιμοποιείται το εναλλακτικό όργανο καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

29. Παράλληλα με το κύριο όργανο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια δεύτερη συσκευή, όπως σταθμικός ηθμός ή πλυντρίδα αερίου/φυσαλιδοδείκτης, για να επιβεβαιώνει την απόδοση συλλογής του κύριου οργάνου. Η κατά μάζα συγκέντρωση που λαμβάνεται με ανάλυση μεγέθους σωματιδίων θα πρέπει να περικλείεται εντός των εύλογων ορίων συγκέντρωσης κατά μάζα που προκύπτουν από σταθμική ανάλυση [βλέπε GD 39 (2)]. Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία σε όλες τις ελεγχόμενες συγκεντρώσεις σε πρώιμο στάδιο της μελέτης, μπορούν να παραλείπονται οι περαιτέρω επιβεβαιωτικές μετρήσεις. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε να ελαχιστοποιούνται τα αβέβαια δεδομένα που ενδέχεται να οδηγούν σε ανάγκη επανάληψης μιας μελέτης.

30. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων στην περίπτωση των ατμών, εάν υπάρχει πιθανότητα η συμπύκνωση των ατμών να οδηγήσει στον σχηματισμό αερολύματος ή εάν ανιχνεύονται σε ατμόσφαιρα ατμών σωματίδια με δυναμικό σχηματισμού μεικτών φάσεων.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

31. Τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε κλινική παρατήρηση πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την περίοδο έκθεσης. Μπορεί να ενδείκνυνται συχνότερες παρατηρήσεις ανάλογα με την αντίδραση των ζώων κατά τη διάρκεια της έκθεσης. Όταν δεν είναι δυνατή η παρατήρηση των ζώων λόγω της χρήσης σωλήνων συγκράτησης, ανεπαρκούς φωτισμού των θαλάμων ολόσωμης έκθεσης ή αδιαφανούς ατμόσφαιρας, θα πρέπει να παρατηρούνται προσεκτικά τα ζώα μετά την έκθεση. Μέσω παρατηρήσεων πριν από την έκθεση της επόμενης ημέρας είναι δυνατόν να αξιολογηθεί τυχόν αναστρεψιμότητα ή επιδείνωση των τοξικών επιδράσεων.

▼M4

32. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται χωριστά για κάθε ζώο. Ο χρόνος θανάτου των ζώων που θανατώνονται προκειμένου να μην ταλαιπωρηθούν ή βρίσκονται νεκρά καταγράφεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

33. Οι παρατηρήσεις στον κλωβό θα πρέπει να περιλαμβάνουν τις αλλαγές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, στο αναπνευστικό, στο κυκλοφοριακό και στο νευρικό σύστημα, καθώς και τις αλλαγές στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην παρατήρηση τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του ορθού μπορεί να παρέχει υποστηρικτικά αποδεικτικά στοιχεία αντανακλαστικής βραδύπνοιας ή υποθερμίας/υπερθερμίας που σχετίζεται με την αγωγή ή τη στέρηση της ελευθερίας. Είναι δυνατόν να συμπεριλαμβάνονται επίσης στο πρωτόκολλο της μελέτης πρόσθετες αξιολογήσεις που αφορούν, μεταξύ άλλων, την κινητική, τη βιοπαρακολούθηση, τη λειτουργία των πνευμόνων, την κατακράτηση δυσδιάλυτων υλικών τα οποία συσσωρεύονται στους ιστούς των πνευμόνων και τις αλλαγές στη συμπεριφορά.

ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ

34. Θα πρέπει να καταγράφεται το βάρος κάθε ζώου λίγο πριν από την πρώτη έκθεση (ημέρα 0) και, στη συνέχεια, δύο φορές την εβδομάδα (π.χ. κάθε Παρασκευή και Δευτέρα, ώστε να καταδεικνύεται η ανάρρωση μετά από Σαββατοκύριακο χωρίς έκθεση, ή ανά χρονικά διαστήματα που επιτρέπουν την αξιολόγηση της συστημικής τοξικότητας), καθώς και κατά τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας. Εάν δεν εμφανιστούν επιδράσεις κατά τις πρώτες 2 εβδομάδες, το βάρος του σώματος των ζώων μπορεί να μετράται σε εβδομαδιαία βάση για το υπόλοιπο της μελέτης. Η ζύγιση των δορυφορικών ζώων (αναστρεψιμότητας), όταν χρησιμοποιούνται, θα πρέπει να συνεχίζεται σε εβδομαδιαία βάση καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου ανάρρωσης. Κατά την ολοκλήρωση της μελέτης, θα πρέπει να ζυγίζονται όλα τα ζώα λίγο πριν από τη θανάτωση ώστε να υπολογίζονται χωρίς συστηματικά σφάλματα οι λόγοι βάρους οργάνων προς βάρος σώματος.

ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΝΕΡΟΥ

35. Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται σε εβδομαδιαία βάση. Μπορεί επίσης να μετράται η κατανάλωση νερού.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

36. Θα πρέπει να πραγματοποιούνται εκτιμήσεις κλινικής παθολογίας για όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των ζώων-μαρτύρων και των δορυφορικών ζώων (αναστρεψιμότητας), κατά τη θανάτωσή τους. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από το τέλος της έκθεσης έως την αιμοληψία θα πρέπει να καταγράφεται, ιδίως όταν η αποκατάσταση του εξεταζόμενου καταληκτικού σημείου είναι ταχεία. Ενδείκνυται η δειγματοληψία μετά το τέλος της έκθεσης για τις παραμέτρους με μικρό χρόνο υποδιπλασιασμού στο πλάσμα (π.χ. COHb, CHE και MetHb).

37. Στον πίνακα 1 παρατίθενται οι παράμετροι κλινικής παθολογίας που απαιτούνται γενικά σε όλες τις τοξικολογικές μελέτες. Δεν απαιτείται συστηματική ανάλυση ούρων, αλλά μπορεί να γίνεται όταν κρίνεται χρήσιμο βάσει της αναμενόμενης ή παρατηρούμενης τοξικότητας. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να αξιολογήσει πρόσθετες παραμέτρους για τον καλύτερο χαρακτηρισμό της τοξικότητας μιας χημικής ουσίας (π.χ. χολινεστεράση, λιπίδια, ορμόνες, οξεοβασική ισορροπία, μεθαιμοσφαιρίνη ή σωμάτια Heinz, κινάση κρεατίνης, λόγος μυελικών κυττάρων/ερυθρών αιμοσφαιρίων, τροπονίνες, αέρια αρτηριακού αίματος, γαλακτική αφυδρογονάση, αφυδρογονάση σορβιτόλης, γλουταμική αφυδρογονάση και γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση).

▼M4

Πίνακας 1

Τυπικές παράμετροι κλινικής παθολογίας

Αιματολογία	
Αριθμός ερυθροκυττάρων	Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων
Αιματοκρίτης	Λευκοκυτταρικός τύπος
Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης	Αριθμός αιμοπεταλίων
Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης	Πηκτικότητα (επιλέγεται ένα):
Μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων	— Χρόνος προθρομβίνης
Μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης	— Χρόνος πήξης
Δικτυοερυθροκύτταρα	— Μερικός χρόνος θρομβοπλαστίνης
Κλινική χημεία	
Γλυκόζη (*)	Αλανινο-αμινοτρανσφεράση
Ολική χοληστερόλη	Ασπαργινική αμινοτρανσφεράση
Τριγλυκερίδια	Αλκαλική φωσφατάση
Άζωτο ουρίας αίματος	Κάλιο
Ολική χολερυθρίνη	Νάτριο
Κρεατινίνη	Ασβέστιο
Ολικές πρωτεΐνες	Φωσφόρος
Αλβουμίνη	Χλωριούχα άλατα
Σφαιρίνη	
Ανάλυση ούρων (προαιρετική)	
Όψη (χρώμα και θολερότητα)	Ολικές πρωτεΐνες
Όγκος	Γλυκόζη
Ειδικό βάρος ή ωσμοτικότητα	Αίμα/Αιμοκύτταρα
pH	

(*) Δεδομένου ότι η μακρά περίοδος νηστείας μπορεί να επιφέρει συστηματικό σφάλμα στις μετρήσεις γλυκόζης των ζώων που υποβάλλονται σε αγωγή σε σχέση με τα ζώα-μάρτυρες, ο διευθυντής της μελέτης θα πρέπει να κρίνει αν είναι σκόπιμο να υποβληθούν τα ζώα σε νηστεία. Εάν εφαρμόζεται περίοδος νηστείας, θα πρέπει να είναι κατάλληλη για τα χρησιμοποιούμενα είδη. Στην περίπτωση των επιμύων, η περίοδος αυτή μπορεί να είναι 16 ώρες (ολονύκτια νηστεία). Ο προσδιορισμός της γλυκόζης μετά από νηστεία μπορεί να εκτελείται μετά από ολονύκτια νηστεία κατά την τελευταία εβδομάδα έκθεσης ή μετά από ολονύχτια νηστεία πριν από τη νεκροψία (στη δεύτερη περίπτωση, ταυτόχρονα με τη μέτρηση όλων των άλλων παραμέτρων κλινικής παθολογίας).

38. Εάν υπάρχουν ενδείξεις απόθεσης και κατακράτησης κυρίως στην κατώτερη αναπνευστική οδό (ήτοι στις κυψελίδες), το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) μπορεί να είναι η προτιμητέα τεχνική για την ποσοτική ανάλυση παραμέτρων δόσης-επιδράσεων βάσει παραδοχών, με εστίαση στην κυψελίτιδα, την πνευμονική φλεγμονή και τη φωσφολιπίδωση. Με τον τρόπο αυτόν διερευνώνται κατάλληλα οι αλλαγές στις κακώσεις των κυψελίδων βάσει της σχέσης δόσης-απόκρισης και της χρονικής διάρκειας. Το υγρό του BAL μπορεί να υποβληθεί σε ανάλυση για τον προσδιορισμό του αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων και του λευκοκυτταρικού τύπου, των ολικών πρωτεϊνών και της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Άλλες παράμετροι που μπορούν να εξετάζονται είναι αυτές που παρέχουν ενδείξεις κακώσεων των λυσοσωμάτων, φωσφολιπίδωσης, ίνωσης και ερεθιστικής ή αλλεργικής φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένου ενδεχομένως του προσδιορισμού προφλεγμονωδών κυτοκινών/χημοκινών. Οι μετρήσεις BAL συμπληρώνουν γενικά τα αποτελέσματα των ιστοπαθολογικών εξετάσεων αλλά δεν μπορούν να τις αντικαταστήσουν. Καθοδήγηση για τον τρόπο έκπλυσης των πνευμόνων παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

▼M4

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΒΑΡΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

39. Όλα τα πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένων όσων πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή αποσύρονται από τη μελέτη για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη αφαίμαξη (εάν είναι εφικτό) και νεκροψία. Θα πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ του τέλους της τελευταίας έκθεσης κάθε ζώου και της θανάτωσής του. Εάν δεν μπορεί να γίνει νεκροψία αμέσως μετά την ανακάλυψη νεκρού ζώου, το ζώο θα πρέπει να ψύχεται (όχι να καταψύχεται) σε θερμοκρασία αρκετά χαμηλή ώστε να ελαχιστοποιείται η αυτόλυση. Η νεκροψία θα πρέπει να εκτελείται το ταχύτερο δυνατόν, κατά κανόνα εντός μιας ή δύο ημερών. Όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις θα πρέπει να καταγράφονται για κάθε ζώο, με ιδιαίτερη προσοχή σε τυχόν αλλοιώσεις της αναπνευστικής οδού.

40. Στον πίνακα 2 εμφαίνονται τα όργανα και οι ιστοί που θα πρέπει να διατηρούνται σε κατάλληλο μέσο κατά τη νεκροψία για ιστοπαθολογική εξέταση. Η διατήρηση των οργάνων και ιστών που αναφέρονται εντός αγκίστρων, καθώς και άλλων οργάνων και ιστών επαφίεται στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Τα όργανα που αναφέρονται με **έντονους χαρακτήρες** θα πρέπει να καθαρίζονται από ιστούς και να ζυγίζονται υγρά το συντομότερο δυνατό μετά την ανατομή, ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Ο θυρεοειδής αδένας και οι επιδιδυμίδες θα πρέπει να ζυγίζονται μόνο εάν χρειάζεται, διότι τεχνητές ενδείξεις (artefacts) που οφείλονται στον καθαρισμό είναι δυνατόν να εμποδίσουν την ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Οι ιστοί και τα όργανα θα πρέπει να μονιμοποιούνται σε φορμαλίνη με ρυθμιστικό διάλυμα 10 % ή άλλο κατάλληλο μονιμοποιητικό υλικό, αμέσως μετά τη νεκροψία και τουλάχιστον 24-48 ώρες πριν από τον καθαρισμό τους από ιστούς, ανάλογα με το μονιμοποιητικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί.

Πίνακας 2

Διατηρούμενα όργανα και ιστοί κατά τη νεκροψία

Επινεφρίδια	Σπερματοδόχες κύστεις
Μυελός των οστών (και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών)	Νωτιαίος μυελός (αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)
Εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	**Σπλήνα**
	Στομάχι
[Οφθαλμοί (αμφιβληστροειδής, οπτικό νεύρο) και βλέφαρα]	**Όρχεις**
	Θύμος
Καρδιά	Θυρεοειδής
Νεφροί	Τραχεία (τουλάχιστον 2 επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης 1 διαμήκους τομής μέσω της τρόπιδας και 1 εγκάρσιας τομής)
Λάρυγγας (3 επίπεδα, 1 επίπεδο πρέπει να περιλαμβάνει τη βάση της επιγλωττίδας)	[Ουροδόχος κύστη]
Ήπαρ	Μήτρα
Πνεύμονας (όλοι οι λοβοί σε ένα επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων των κυρίων βρόγχων)	Όλοι οι ιστοί με μακροσκοπικές αλλοιώσεις
Λεμφαδένες από την πυλαία περιοχή του πνεύμονα, ιδίως στην περίπτωση δυσδιάλυτων ελεγχόμενων χημικών ουσιών σε σωματιδιακή μορφή. Για περισσότερο ενδελεχείς εξετάσεις και/ή μελέτες με ανοσολογική εστίαση, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης περισσότερων λεμφαδένων, π.χ. από τη μεσοθωρακική, την αυχενική/υπογνάθια και/ή την ωτική περιοχή.	
Ρινοφαρυγγικοί ιστοί (τουλάχιστον 4 επίπεδα· 1 επίπεδο πρέπει να περιλαμβάνει τον ρινοφαρυγγικό πόρο και τον λεμφικό ιστό που συνοδεύει τη ρινική κοιλότητα (NALT).	
Οισοφάγος	
[Οσφρητικός βολβός]	
Ωοθήκες	

▼M4

41. Οι πνεύμονες θα πρέπει να αφαιρούνται άθικτοι, να ζυγίζονται και να διαποτίζονται με κατάλληλο μονιμοποιητικό υλικό υπό πίεση 20-30 cm στήλης νερού ώστε να εξασφαλίζεται η διατήρηση της δομής τους (5). Πρέπει να συλλέγονται τομές όλων των λοβών σε ένα επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων των κυρίων βρόγχων, αλλά σε περίπτωση έκπλυσης των πνευμόνων, ο λοβός που δεν έχει εκπλυθεί θα πρέπει να τέμνεται σε τρία επίπεδα (όχι σειριακές τομές).

42. Θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον 4 επίπεδα των ρινοφαρυγγικών ιστών, ένα από τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνει τον ρινοφαρυγγικό πόρο (5, 6, 7, 8, 9), ώστε να εξετάζονται επαρκώς το πλακώδες, το μεταβατικό (μη βλεφαριδοφόρο αναπνευστικό), το αναπνευστικό (βλεφαριδοφόρο αναπνευστικό) και το οσφρητικό επιθήλιο, καθώς και ο λεμφικός ιστός αποχέτευσης (NALT· 10, 11). Θα πρέπει να εξετάζονται τρία επίπεδα του λάρυγγα, ένα από τα οποία πρέπει να περιλαμβάνει τη βάση της επιγλωττίδας (12). Θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο επίπεδα της τραχείας, συμπεριλαμβανομένης μιας διαμήκους τομής, μέσω της τρόπιδας, της διακλάδωσης των εξωπνευμονικών βρόχων και μιας εγκάρσιας τομής.

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

43. Θα πρέπει να διενεργείται ιστοπαθολογική αξιολόγηση όλων των οργάνων και ιστών που αναφέρονται στον πίνακα 2, για την ομάδα μάρτυρα και τις ομάδες υψηλής συγκέντρωσης και για όλα τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην αναπνευστική οδό, στα όργανα-στόχο και στις μακροσκοπικές βλάβες. Τα όργανα και οι ιστοί που παρουσιάζουν βλάβες στην ομάδα υψηλής συγκέντρωσης θα πρέπει να εξετάζονται σε όλες τις ομάδες. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να διενεργήσει ιστοπαθολογική αξιολόγηση επιπρόσθετων ομάδων ώστε να καταδειχθεί σαφής σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης. Σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί δορυφορική ομάδα (αναστρεψιμότητας), απαιτείται ιστοπαθολογική αξιολόγηση όλων των ιστών και των οργάνων που διαπιστώθηκε ότι παρουσίασαν αλλοιώσεις στις ομάδες αγωγής. Εάν στην ομάδα υψηλής έκθεσης σημειωθεί υπερβολικός αριθμός πρώιμων θανάτων ή άλλων προβλημάτων που επηρεάζουν αρνητικά τη σημαντικότητα των δεδομένων, θα πρέπει να γίνει ιστοπαθολογική εξέταση στην ομάδα της αμέσως επόμενης χαμηλότερης συγκέντρωσης. Θα πρέπει να επιχειρείται συσχετισμός των μακροσκοπικών παρατηρήσεων με τα μικροσκοπικά ευρήματα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

44. Θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο σχετικά με το βάρος του, την κατανάλωση τροφής, την κλινική παθολογία, την παθολογοανατομία, το βάρος των οργάνων του και την ιστοπαθολογία. Τα δεδομένα κλινικής παρατήρησης πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των χρησιμοποιηθέντων ζώων, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν συγκεκριμένες τοξικές εκδηλώσεις, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και χρονική εξέλιξη των τοξικών επιδράσεων, αναστρεψιμότητα και ευρήματα νεκροψίας. Όλα τα αποτελέσματα, ποσοτικά και συμπτωματικά, πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηείται οποιαδήποτε στατιστική μέθοδος γενικής αποδοχής, η οποία πρέπει να επιλέγεται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης.

Έκθεση δοκιμής

45. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Πειραματόζωα και ζωοτεχνία

— περιγραφή των συνθηκών στέγασης σε κλωβούς, συμπεριλαμβανομένων των εξής: αριθμός (ή μεταβολή του αριθμού) ζώων ανά κλωβό, στρωμνή, θερμοκρασία και σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, φωτοπερίοδος και προσδιορισμός του σιτηρεσίου,

▼M4

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης άλλου είδους πλην του επίμυ· μπορούν να παρέχονται δεδομένα πηγής και ιστορικά δεδομένα, εφόσον προέρχονται από ζώα που έχουν υποβληθεί σε παρόμοιες συνθήκες έκθεσης, στέγασης και νηστείας,

— αριθμός ηλικία και φύλο των ζώων,

— μέθοδος τυχαιοποίησης,

— περιγραφή τυχόν προετοιμασίας πριν από τον έλεγχο, συμπεριλαμβανομένων του σιτηρεσίου, της περιόδου υγειονομικής απομόνωσης και της αγωγής για ασθένειες.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, κατά περίπτωση, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης),

— στοιχεία ταυτότητας και αριθμός CAS, εάν είναι γνωστός.

Φορέας

— αιτιολόγηση της χρήσης φορέα και της επιλογής του φορέα (εάν δεν είναι το νερό),

— ιστορικά ή παράλληλα δεδομένα που καταδεικνύουν ότι ο φορέας δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της μελέτης.

Θάλαμος εισπνοής

— αναλυτική περιγραφή του θαλάμου εισπνοής, συμπεριλαμβανομένων του όγκου και ενός διαγράμματος,

— πηγή και περιγραφή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την έκθεση των ζώων, καθώς και για τη δημιουργία της ατμόσφαιρας,

— εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας, του μεγέθους σωματιδίων και της πραγματικής συγκέντρωσης,

— πηγή αέρα και χρησιμοποιούμενο σύστημα κλιματισμού,

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση του εξοπλισμού ώστε να εξασφαλίζεται ομοιογενής πειραματική ατμόσφαιρα,

— διαφορά πίεσης (θετική ή αρνητική),

— θύρες έκθεσης ανά θάλαμο (ρινική έκθεση)· θέση των ζώων στον θάλαμο (ολόσωμη έκθεση),

— σταθερότητα της πειραματικής ατμόσφαιρας,

— θέση των αισθητήρων θερμοκρασίας και υγρασίας και δειγματοληψία της πειραματικής ατμόσφαιρας στον θάλαμο,

— επεξεργασία του παρεχόμενου/απαγόμενου αέρα,

— ταχύτητες ροής αέρα, ταχύτητα ροής αέρα/θύρα έκθεσης (ρινική έκθεση) ή φορτίο ζώων/θάλαμο (ολόσωμη έκθεση),

— χρόνος για την επίτευξη ισορροπίας στον θάλαμο εισπνοής (t95),

— αριθμός αλλαγών όγκου ανά ώρα,

— συσκευές μέτρησης (κατά περίπτωση).

Δεδομένα έκθεσης

— αιτιολόγηση της επιλογής της συγκέντρωσης στόχου για την κυρίως μελέτη,

▼M4

— ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσα στον θάλαμο εισπνοής διά του όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του θαλάμου),

— πραγματικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που λαμβάνονται από τη ζώνη αναπνοής των ζώων· για μείγματα που παράγουν ετερογενείς φυσικές μορφές (αέρια, ατμούς, αερολύματα), καθεμιά μπορεί να αναλύεται χωριστά,

— όλες οι ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αναφέρονται σε μονάδες μάζας (mg/l mg/m^3 κ.λπ.) και όχι σε μονάδες όγκου (ppm, ppb κ.λπ.),

— κατανομή μεγέθους σωματιδίων, διάμεσος αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) και γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g), συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων υπολογισμού τους. Θα πρέπει να αναφέρονται οι επιμέρους αναλύσεις μεγέθους σωματιδίων.

Συνθήκες δοκιμής

— λεπτομερή στοιχεία για το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένων λεπτομερειών σχετικά με τις διαδικασίες που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν για τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων στερεών ή για την παρασκευή διαλυμάτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— περιγραφή (κατά προτίμηση συνοδευόμενη από διάγραμμα) του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας και την έκθεση των ζώων σε αυτή,

— λεπτομερή στοιχεία σχετικά με τον εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της θερμοκρασίας του θαλάμου, της υγρασίας του και της ροής αέρα σε αυτόν (δηλαδή καμπύλη βαθμονόμησης),

— λεπτομερή στοιχεία σχετικά με τον εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή δειγμάτων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της κατανομής μεγέθους σωματιδίων στον θάλαμο,

— λεπτομερή στοιχεία για τη χημική αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε και την επικύρωσή της (συμπεριλαμβανομένης της απόδοσης ανάκτησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το μέσο δειγματοληψίας),

— μέθοδος τυχαιοποίησης κατά την κατανομή των ζώων στις ομάδες δοκιμής και μαρτύρων,

— λεπτομερή στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού (συμπεριλαμβανομένων του είδους και της πηγής του σιτηρεσίου και της πηγής του νερού),

— αιτιολόγηση της επιλογής των συγκεντρώσεων δοκιμής.

Αποτελέσματα

— πίνακας με τη θερμοκρασία του θαλάμου, την υγρασία του και τη ροή αέρα σε αυτόν,

— πίνακας με τα δεδομένα ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων στον θάλαμο,

— πίνακας με τα δεδομένα μεγέθους σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων για τη συλλογή του δείγματος ανάλυσης, της κατανομής μεγέθους σωματιδίων και των υπολογισμών της MMAD και της σ_g,

— πίνακας με τα δεδομένα απόκρισης και το επίπεδο συγκέντρωσης για κάθε ζώο (δηλαδή ζώα που παρουσίασαν εκδηλώσεις τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, και φύση, σοβαρότητα, χρόνος εμφάνισης και διάρκεια των επιδράσεων),

▼**M4**

— πίνακας με το βάρος κάθε ζώου,

— πίνακας με την κατανάλωση τροφής,

— πίνακας με τα δεδομένα κλινικής παθολογίας,

— ευρήματα νεκροψίας και ιστοπαθολογικά ευρήματα για καθένα από τα ζώα, εφόσον υπάρχουν,

— πίνακας με άλλες παραμέτρους που μετρήθηκαν.

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

— Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δίδεται στην περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την εκπλήρωση των κριτηρίων της παρούσας μεθόδου δοκιμών, π.χ. της οριακής συγκέντρωσης ή του μεγέθους σωματιδίων.

— Θα πρέπει να καλύπτεται το ζήτημα της εισπνευσιμότητας των σωματιδίων βάσει των συνολικών ευρημάτων, ιδίως εάν τα σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων κριτήρια δεν ήταν δυνατό να εκπληρωθούν.

— Η συνολική αξιολόγηση της μελέτης πρέπει να περιλαμβάνει τη συνέπεια μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων και τη σχέση της πραγματικής προς την ονομαστική συγκέντρωση.

— Θα πρέπει να αναφέρεται η πιθανή αιτία θανάτου και ο επικρατέστερος τρόπος δράσης (συστημική δράση έναντι τοπικής).

— Θα πρέπει να παρέχονται εξηγήσεις εάν χρειάστηκε να θανατωθούν με ευθανασία ζώα που υπέφεραν ή εμφάνιζαν εκδηλώσεις έντονης και διαρκούς δυσφορίας, βάσει των κριτηρίων του εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (3).

— Θα πρέπει να προσδιορίζονται τα όργανα-στόχοι.

— Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι τιμές NOAEL και LOAEL.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (1981), Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan J.E. και Redden J.C. (1994), Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies, Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985), Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. και Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young J.T. (1981), Histopathological examination of the rat nasal cavity, *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309-312.

(7) Harkema J.R. (1990), Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants, *Environ. Health Perspect.* 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994), Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans, στο: Waalkes M.P. και Ward J.M. (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994), Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice, *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992), The role of nasopharyngeal lymphoid tissue, *Immunol. Today* 13: 219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003), Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue, *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.

(12) Lewis D.J. (1981), Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia, *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.

(13) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 (ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1).

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών..

▼B

B.9. **ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ (28 ΗΜΕΡΕΣ) ΔΟΣΗΣ (ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ)**

1 **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Α).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή, Μέρος Β (Β).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουδεμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξεταζόμενη ουσία εφαρμόζεται καθημερινά στο δέρμα σε διαβαθμισμένες δόσεις, σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων, μία δόση ανά ομάδα, για μια χρονική περίοδο 28 ημερών. Κατά τη διάρκεια της περιόδου εφαρμογής, τα ζώα εξετάζονται καθημερινά για τη διαπίστωση τοξικών συμπτωμάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής, όπως και αυτά που επιζούν στη λήξη της, νεκροτομούνται.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ουδέν.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Προετοιμασίες**

Τα ζώα κρατούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής για 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμή υγιή, νεαρά ζώα ξεχωρίζονται τυχαία και κατανέμονται στις πειραματικές ομάδες και τις ομάδες μαρτύρων. Λίγο πριν αρχίσει η δοκιμή το τρίχωμα ψαλιδίζεται από την περιοχή της ράχης του κορμού των πειραματόζωων. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί το ξύρισμα για την απομάκρυνση του τριχώματος, αλλά αυτό πρέπει να γίνεται 24 ώρες περίπου πριν από τη δοκιμή. Επανάληψη του ψαλιδίσματος ή του ξυρίσματος χρειάζεται συνήθως κάθε εβδομάδα. Το ψαλίδισμα ή ξύρισμα πρέπει να γίνεται με προσοχή, ώστε να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος. Πρέπει να καθαρίζεται μια περιοχή για την εφαρμογή της εξεταζόμενης ουσίας, η οποία δεν πρέπει να είναι μικρότερη από το 10 % της επιφάνειας του σώματος. Όταν αποφασίζονται οι διαστάσεις της περιοχής που πρέπει να καθαριστεί και να καλυφθεί με την εξεταζόμενη ουσία, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το βάρος του ζώου. Όταν ελέγχονται στερεά, τα οποία μπορούν να κονιοποιηθούν, πρέπει να υγραίνονται αρκετά με νερό ή αν χρειαστεί με κατάλληλο φορέα, για να εξασφαλιστεί η καλή επαφή με το δέρμα. Οι υγρές ουσίες χρησιμοποιούνται συνήθως αδιάλυτες. Η εφαρμογή γίνεται καθημερινά 5 έως 7 ημέρες την εβδομάδα.

1.6.2. **Πειραματικές συνθήκες**

1.6.2.1. *Πειραματόζωα*

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενήλικας επίμυς, κουνέλι ή ινδικό χοιρίδιο. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, η χρήση τους όμως απαιτεί αιτιολόγηση.

▼B

Στην αρχή της μελέτης, το εύρος της διαφοράς βαρών των χρησιμοποιούμενων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % της ενδεδειγμένης μέσης τιμής.

1.6.2.2. *Αριθμός και φύλο*

Σε κάθε επίπεδο δόσεων πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 ζώα (5 θηλυκά και 5 αρσενικά) με υγιές δέρμα. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, τότε ο αριθμός των ζώων ανά ομάδα πρέπει να αυξηθεί με τον αριθμό των ζώων που είναι προγραμματισμένο να θανατωθούν πριν από τη συμπλήρωση της μελέτης. Επιπλέον, μια δορυφορική ομάδα από 10 ζώα (5 ζώα ανά φύλο) μπορεί να εκτεθεί στην υψηλότερη δόση για 28 ημέρες και να εξετασθεί για επαναφορά, εμμονή ή αργοπορημένη εμφάνιση των τοξικών επιδράσεων για ένα χρονικό διάστημα 14 ημερών μετά το πέρας της δηλητηρίασης. Χρησιμοποιείται επίσης και μία δορυφορική ομάδα από 10 ζώα μάρτυρες (πέντε ζώα κατά φύλο).

1.6.2.3. *Επίπεδα δόσεων*

Απαιτούνται τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσεων και ένας μάρτυρας ή ένας μάρτυρας του φορέα, αν χρησιμοποιείται φορέας. Η περίοδος έκθεσης πρέπει να είναι τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα. Η εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να γίνεται την ίδια ώρα κάθε μέρα και να προσαρμόζεται κατά διαστήματα (μια ή δύο φορές την εβδομάδα), έτσι ώστε να διατηρείται ένα σταθερό επίπεδο δόσεων σε σχέση με το βάρος του σώματος των ζώων. Τα ζώα στην ομάδα του μάρτυρα πρέπει να υπόκεινται στην ίδια μεταχείριση με τα πειραματόζωα, εξαιρουμένης της εφαρμογής της εξεταζόμενης ουσίας. Όταν χρησιμοποιείται φορέας για διευκόλυνση της χορήγησης της δόσης, η ομάδα του μάρτυρα πρέπει να παίρνει τη δόση κατά τον ίδιο τρόπο με την ομάδα των πειραματόζωων και η ποσότητα της δόσης να είναι ίδια με την υψηλότερη δόση που παίρνουν τα πειραματόζωα. Η υψηλότερη δόση θα πρέπει να προκαλεί τοξικές επιδράσεις, αλλά λίγους ή καθόλου θανάτους. Η χαμηλότερη δόση δεν θα πρέπει να προκαλεί συμπτώματα τοξικότητας. Όταν υπάρχει μια ευχερής εκτίμηση της ανθρώπινης έκθεσης, η χαμηλότερη δόση θα πρέπει να την υπερβαίνει. Η ενδιάμεση δόση, στην πιο ιδανική περίπτωση, θα πρέπει να προκαλεί ελάχιστα ευδιάκριτα τοξικά συμπτώματα. Εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία ενδιάμεσες δόσεις, τότε αυτές πρέπει να απέχουν έτσι μεταξύ τους ώστε να προκαλούν διαβαθμισμένες τοξικές επιδράσεις. Στις χαμηλές και στις ενδιάμεσες ομάδες, όπως και στους μάρτυρες, η συχνότητα των θανάτων θα πρέπει να είναι χαμηλή, ώστε να επιτρέπει μια χρήσιμη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Εάν η εφαρμογή της εξεταζόμενης ουσίας προκαλεί σοβαρό δερματικό ερεθισμό, οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να ελαττωθούν και αυτό μπορεί να ελαττώσει ή να εξαφανίσει τις άλλες τοξικές επιδράσεις στην υψηλότερη δόση. Επιπλέον, αν το δέρμα έχει υποστεί σοβαρή βλάβη, είναι δυνατόν να χρειαστεί, να ακυρωθεί η μελέτη και να επιχειρηθεί ένα νέο πείραμα με χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

1.6.2.4. *Οριακή δοκιμή*

Αν μια προκαταρκτική μελέτη με μια δόση 1 000 mg/kg ή και μεγαλύτερη, σχετική με το πιθανό όριο έκθεσης του ανθρώπινου πληθυσμού, εάν είναι γνωστό, δεν προκαλεί καμιά τοξική επίδραση, ο περαιτέρω πειραματισμός μπορεί να μη θεωρηθεί αναγκαίος.

1.6.2.5. *Περίοδος παρατήρησης*

Τα πειραματόζωα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά για φαινόμενα τοξικότητας. Ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος κατά τον οποίο εμφανίζονται και εξαφανίζονται τα τοξικά συμπτώματα πρέπει να καταγράφονται.

▼B

1.6.3. **Διαδικασία**

Τα ζώα πρέπει να εγκλωβίζονται μεμονωμένα. Η επέμβαση στα ζώα με την εξεταζόμενη ουσία γίνεται, στην πιο ιδανική περίπτωση, 7 ημέρες την εβδομάδα, για μια περίοδο 28 ημερών. Τα ζώα κάθε δορυφορικής ομάδας που προγραμματίστηκαν για συνεχείς παρατηρήσεις πρέπει να διατηρηθούν για 14 επιπλέον ημέρες χωρίς επέμβαση, για να εξακριβωθεί η ανάρρωση από τις τοξικές επιδράσεις ή η εμμονή τους. Ο χρόνος έκθεσης πρέπει να είναι τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα.

Η εξεταζόμενη ουσία πρέπει να εφαρμόζεται ομοιόμορφα σε μια έκταση, η οποία είναι περίπου το 10 % της όλης επιφάνειας του σώματος. Με πολύ τοξικές ουσίες η καλυπτόμενη επιφάνεια μπορεί να είναι μικρότερη, αλλά όσο γίνεται περισσότερη από την επιφάνεια πρέπει να καλύπτεται με μία λεπτή και ομοιόμορφη στοιβάδα ουσίας.

Η εξεταζόμενη ουσία, κρατιέται σ' επαφή με το δέρμα κατά τη διάρκεια της έκθεσης, με τη βοήθεια επιδέσμου από πορώδη γάζα και μιας μη ερεθιστικής ταινίας. Η δοκιμαζόμενη περιοχή πρέπει, επιπλέον, να καλύπτεται κατάλληλα, ώστε να συγκρατείται ο επίδεσμος και η εξεταζόμενη ουσία και έτσι να εξασφαλίζεται η μη κατάποσή της από τα πειραματόζωα. Για να αποφευχθεί η κατάποση της εξεταζόμενης ουσίας, μπορεί να χρησιμοποιούνται επίσης συσκευές περιορισμού των ζώων, αλλά δεν συνιστάται η μέθοδος της απόλυτης ακινησίας. Ως εναλλακτική λύση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα «προστατευτικό κολλάρο».

Η ουσία που μένει σαν υπόλειμμα, στο τέλος της περιόδου έκθεσης, θα πρέπει να απομακρύνεται όταν αυτό είναι δυνατό με νερό ή άλλη κατάλληλη μέθοδο καθαρισμού του δέρματος.

Όλα τα πειραματόζωα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά και να καταγράφονται τα τοξικά συμπτώματα, ο χρόνος έναρξής τους, ο βαθμός και η διάρκειά τους. Οι παρατηρήσεις πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις στο δέρμα και στο τρίχωμα, στα μάτια και στους βλεννογόνους, όπως επίσης στο αναπνευστικό, κυκλοφοριακό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Πρέπει, επίσης, να γίνονται μετρήσεις της κατανάλωσης τροφής και του βάρους των ζώων μια φορά την εβδομάδα. Η κανονική παρατήρηση των ζώων είναι απαραίτητη για να εξασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει απώλεια πειραματόζωων εξαιτίας κανιβαλισμού, αυτόλυσης των ιστών ή κακής στέγασης. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου, όλα τα επιζώντα ζώα στις μη δορυφορικές ομάδες νεκροτομούνται. Τα ετοιμοθάνατα ζώα και τα ζώα που παρουσιάζουν συμπτώματα έντονου πόνου και δυσφορίας θα πρέπει να απομακρύνονται, μόλις αυτό γίνεται αντιληπτό, να θανατώνονται ανώδυνα και να νεκροτομούνται.

Οι παρακάτω εξετάσεις θα πρέπει να γίνουν στο τέλος της δοκιμής σε όλα τα ζώα, των μαρτύρων συμπεριλαμβανομένων:

1) αιματολογικές που να περιλαμβάνουν τουλάχιστον μετρήσεις αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης, μετρήσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών και λευκοκυτταρικού τύπου, και μια μέτρηση της πηκτικότητας του αίματος·

2) κλινικές βιοχημικές μετρήσεις του αίματος που περιλαμβάνουν τουλάχιστον μια παράμετρο της λειτουργίας του ήπατος και των νεφρών: αλανίνο-αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμίνη-πυροσταφυλική τρανσαμινάση του ορού), ασπαρτική αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμινι-κή οξαλοοξική τρανσαμινάση του ορού), άζωτο ουρίας, αλβουμίνη, κρεατινίνη αίματος, ολική χολερυθρίνη και ολικές πρωτεΐνες του ορού.

Άλλοι προσδιορισμοί, οι οποίοι μπορεί να είναι αναγκαίοι για την τοξικολογική αξιολόγηση, περιλαμβάνουν: ασβέστιο, φωσφόρο, χλώριο, νάτριο, κάλιο, δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, ανάλυση λιπιδίων, ορμονών, ισορροπία οξέων/βάσεων, μεθαιμοσφαιρίνη και δραστικότητα χολινεστεράσης.

▼B

Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθούν και άλλοι βιοχημικοί προσδιορισμοί για την επέκταση της έρευνας των παρατηρηθεισών επιδράσεων.

1.6.4. **Μακροσκοπική νεκροψία**

Όλα τα ζώα της μελέτης πρέπει να υποβληθούν σε μία πλήρη μακροσκοπική νεκροψία. Το συκώτι, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγιστούν νωπά, όσο το δυνατό γρηγορότερα μετά την ανατομή για την αποφυγή αποξήρανσης. Τα όργανα και οι ιστοί, δηλ. φυσιολογικό και εκτεθειμένο δέρμα, συκώτι, νεφρά, σπλήνα, όρχεις, επινεφρίδια, καρδιά και όργανα στόχοι (δηλαδή τα όργανα εκείνα που εμφανίζουν μακροσκοπικές αλλοιώσεις ή μεταβολές μεγέθους) θα πρέπει να διατηρούνται σ' ένα κατάλληλο μέσο για την πιθανή, μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση.

1.6.5. **Ιστοπαθολογική εξέταση**

Η ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να γίνεται στα διατηρηθέντα όργανα των ζώων της ομάδας της υψηλότερης δόσης και των μαρτύρων. Τα όργανα και οι ιστοί που παρουσιάζουν ανωμαλίες, που μπορεί να αποδοθούν στην υψηλότερη δόση της εξεταζόμενης ουσίας, πρέπει να εξετάζονται και σ' όλες τις ομάδες χαμηλότερων δόσεων. Τα ζώα της δορυφορικής ομάδας πρέπει να εξετάζονται ιστολογικά με ιδιαίτερη έμφαση για κείνα τα όργανα που διαπιστώθηκε ότι δείχνουν ανωμαλίες στις άλλες ομάδες.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε πειραματική ομάδα, ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν κάθε τύπο αλλοίωσης.

Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με μια κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

— δεδομένα ζώων (είδος, φυλή, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διατροφή, κ.λπ.)·

— πειραματικές συνθήκες (συμπεριλαμβανομένου και του τύπου του επιδέσμου: προσροφητικού ή μη προσροφητικού)·

— επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του φορέα, αν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις·

— μη τοξικά επίπεδα, όταν είναι δυνατόν·

— δεδομένα τοξικών αποκρίσεων ανά δόση και φύλο·

— χρόνο θανάτου των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης ή αν τα ζώα επιζούν έως το τέλος·

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις·

— το χρόνο που παρατηρήθηκε κάθε ανωμαλία και τη διαδοχική πορεία τους·

— δεδομένα βάρους σώματος και κατανάλωσης τροφής·

— αιματολογικές εξετάσεις που χρησιμοποιήθηκαν και αποτελέσματα·

▼B

— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που χρησιμοποιήθηκαν και αποτελέσματα·

— ευρήματα νεκροψίας·

— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων·

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό·

— συζήτηση των αποτελεσμάτων·

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Δ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Ε).

▼B

Β.10. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΠΩΝ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της *in vitro* δοκιμής χρωμοσωμικών εκτροπών είναι ο εντοπισμός παραγόντων που προκαλούν δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών (1) (2) (3). Οι δοκιμές εκτροπές μπορεί να είναι δύο τύπων, χρωμοσωμικές ή χρωματιδικές. Τα περισσότερα χημικά μεταλλαξιγόνα προκαλούν εκτροπές χρωματιδικού τύπου, απαντώνται όμως και εκτροπές χρωμοσωμικού τύπου. Τυχόν αύξηση στην πολυπλοειδία μπορεί να σημαίνει ότι μία χημική ουσία έχει τη δυνατότητα να επάγει αριθμητικές εκτροπές. Εντούτοις, η παρούσα μέθοδος δεν έχει σχεδιαστεί για τη μέτρηση αριθμητικών εκτροπών και δεν χρησιμοποιείται συνήθως για το σκοπό αυτό. Οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και τα συναφή συμβάντα αποτελούν αίτιο πολλών γενετικών ασθενειών του ανθρώπου και υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και τα συναφή συμβάντα που προκαλούν αλλοιώσεις σε ογκογονίδια και ογκογενή αποκαταστατικά γονίδια σωματικών κυττάρων σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου σε ανθρώπους και σε πειραματόζωα.

Στην *in vitro* δομική χρωμοσωμικών εκτροπών μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες καθιερωμένων κυτταρικών σειρών, κυτταρικών στελεχών ή καλλιέργειες αρχέγονων κυττάρων. Τα χρησιμοποιούμενα κύτταρα επιλέγονται με βάση την ικανότητα ανάπτυξης τους στην καλλιέργεια, τη σταθερότητα του καρυοτύπου, τον αριθμό των χρωμοσωμάτων, την ποικιλότητα των χρωμοσωμάτων και την αυθόρμητη συχνότητα χρωμοσωμικών εκτροπών.

Οι δοκιμές που διεξάγονται *in vitro* απαιτούν εν γένει τη χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης. Το σύστημα αυτό μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μπορεί να μιμηθεί εξ ολοκλήρου τις *in vivo* συνθήκες των θηλαστικών. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να αποφεύγεται η χρήση συνθηκών που μπορεί να οδηγήσουν στη λήψη αποτελεσμάτων τα οποία μπορεί να μην οφείλονται σε εγγενή μεταλλαξιγένεση αλλά να προέχονται από αλλαγές στο pH, την ωσμωμοριακότητα ή υψηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας (4) (5).

Η παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό πιθανών μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων ουσιών στα θηλαστικά. Πολλές ενώσεις που εμφανίζονται θετικές στην παρούσα δοκιμή είναι καρκινογόνες για τα θηλαστικά. Δεν υπάρχει όμως απόλυτη συσχέτιση μεταξύ αυτής της δοκιμής και του φαινομένου της καρκινογενετικότητας. Η συσχέτιση εξαρτάται από τη χημική τάξη και υπάρχουν αύξουσες ενδείξεις ότι υπάρχουν καρκινογόνα που δεν ανιχνεύονται από τη δοκιμή αυτή γιατί δρουν μέσω μηχανισμών που δεν έχουν σχέση με άμεση βλάβη του DNA.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Εκτροπή χρωματιδικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη μεμονωμένων χρωματιδών ή ρήξη και επανένωση μεταξύ χρωματιδών.

Εκτροπή χρωμοσωμικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη, ή ρήξη και επανένωση, και των δύο χρωματιδών στην ίδια θέση.

▼B

Ενδοαναδιπλασιασμός: διεργασία κατά την οποία έπειτα από μία S φάση αντιγραφής DNA. ο πυρήνας δεν υφίσταται μίτωση αλλά ξεκινά μία νέα S φάση. Το αποτέλεσμα είναι χρωμοσώματα με 4, 8, 16, ... χρωματίδες.

Χάσμα: αχρωματική βλάβη μικρότερη από το πλάτος μιας χρωματίδης και με ελάχιστη απευθυγράμμιση των χρωματιδών.

Μιτωτικός δείκτης: ο λόγος των κυττάρων σε μετάφαση διά του συνολικού αριθμού των κυττάρων που παρατηρούνται σε ένα κυτταρικό πληθυσμό· αποτελεί ένδειξη του βαθμού πολλαπλασιασμού του πληθυσμού.

Αριθμητική εκτροπή: μεταβολή του αριθμού των χρωμοσωμάτων από τον κανονικό χαρακτηριστικό αριθμό των χρησιμοποιουμένων κυττάρων.

Πολυπλοειδία: πολλαπλάσιο του απλοειδούς χρωμοσωμικού αριθμού (η) πέραν του διπλοειδούς αριθμού (δηλαδή 3η, 4η κ.ο.κ.).

Δομική εκτροπή: μεταβολή της δομής των χρωμοσωμάτων που εντοπίζεται με παρατήρηση στο μικροσκόπιο του σταδίου της μεταφάσεως της διαίρεσης των κυττάρων και γίνεται αντιληπτή με τη μορφή απαλείψεων και θραυσμάτων, ενδοανταλλαγών ή ανταλλαγών.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Κυτταρικές καλλιέργειες εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Σε προκαθορισμένα διαστήματα μετά την έκθεση των κυτταρικών καλλιεργειών στην υπό δοκιμή ουσία, αυτές υποβάλλονται σε κατεργασία με μία ουσία αναστολής της μετάφασης (π.χ. Colcemid ή κολχικίνη), συλλέγονται, χρωματίζονται και τα μεταφασικά κύτταρα εξετάζονται με μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν χρωμοσωμικές εκτροπές.

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. **Προετοιμασίες**

1.4.1.1. *Κύτταρα*

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες κυτταρικές σειρές, στελέχη ή καλλιέργειες αρχέγονων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και ανθρώπινων κυττάρων (π.χ. ινοβλάστες κινέζικων κρικητών, ανθρώπινα περιφερικά λεμφοκύτταρα αίματος ή λεμφοκύτταρα αίματος άλλων θηλαστικών).

1.4.1.2. *Μέσο και συνθήκες καλλιέργειας*

Για τις καλλιέργειες πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλο μέσο καλλιέργειας και συνθήκες επωάσεως (δοχεία καλλιέργειας, συγκέντρωση CO_2 θερμοκρασία και υγρασία). Οι καθιερωμένες κυτταρικές σειρές και στελέχη πρέπει via ελέγχονται σε τακτική βάση ως προς τη σταθερότητα του υποθετικού χρωμοσωμικού αριθμού και την απουσία μόλυνσης από μυκόπλασμα και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εφόσον έχουν μολυνθεί. Θα πρέπει να είναι γνωστός ο κανονικός χρόνος του κυτταρικού κύκλου για tai κύτταρα και τις χρησιμοποιούμενες συνθήκες καλλιέργειας.

1.4.1.3. *Ετοιμασία των καλλιεργειών*

Καθιερωμένες κυτταρικές σειρές και στελέχη: κύτταρα πολλαπλασιάζονται από έτοιμες καλλιέργειες, ανακαλλιεργούνται σε μέσο καλλιέργειας με πυκνότητα τέτοια ώστε οι καλλιέργειες να μη φθάνουν σε κατάσταση συρροής πριν από το χρόνο συλλογής και επωάζονται στους 37 °C.

▼B

Λεμφοκύτταρα: πλήρες αίμα κατεργασμένο με ένα αντιθρομβωτικό (π.χ. ηπαρίνη) ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα ληφθέντα από υγιή υποκείμενα προστίθενται στο μέσο καλλιέργειας που περιέχει ένα μιτωγόνο (π.χ. φυτοαιμοσυγκολλητίνη) και επωάζονται στους 37 ºC.

1.4.1.4. *Μεταβολική ενεργοποίηση*

Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δομική ουσία παρουσία και απουσία κατάλληλου συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (59) που παρασκευάζεται από ήπαρ τρωκτικών που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες όπως Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) ή μείγμα φαινοβαρτιτόνης και β-ναφσοφλαβόνης (10) (11) (12).

Το μεταμιτοχονδριακό κλάσμα χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 1-10 % v/v στο τελικό μέσο δοκιμής. Η κατάσταση ενός συστήματος μεταβολικές ενεργοποίησης μπορεί να εξαρτάται από την τάξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία συγκεντρώσεις μεταμιτοχονδριακού κλάσματος.

Με ορισμένες αλλαγές, στις οποίες περιλαμβάνεται και η παρασκευή επεξεργασμένων με μεθόδους γενετικής μηχανικής κυτταρικών σειρών που εκφράζουν ειδικά ενεργοποιητικά ένζυμα, ενδέχεται να μπορεί να γίνει και ενδογενής ενεργοποίηση. Η επιλογή των χρησιμοποιουμένων κυτταρικών σειρών πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικώς (π.χ. από τη σχέση του κυτοχρωμικού P 450 ισοενζύμου με το μεταβολισμό της υπό δοκιμή ουσίας).

1.4.1.5. *Υπό δοκιμή ουσία/προετοιμασία*

Οι στερεές υπό δοκιμή ουσίες πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον απαιτείται, πριν από την κατεργασία των κυττάρων. Οι υγρές ουσίες μπορούν να προστίθενται απευθείας στα συστήματα δοκιμής ή/και να αραιώνονται πριν από την κατεργασία. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας στοιχεία επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1. *Διαλύτης/φορέας*

Λεν πρέπει να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδραση του διαλύτη/φορέα με την υπό δοκιμή ουσία ενώ αυτός θα πρέπει να είναι συμβατός με την επιβίωση των κυττάρων και τη δραστικότητα 59. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν είναι από τους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης/φορέας. Όταν εξετάζονται ουσίες που δεν είναι σταθερές στο νερό, οι χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες θα πρέπει να είναι απαλλαγμένοι ύδατος. Το νερό μπορεί να αφαιρεθεί με την προσθήκη μοριακού κόσκινου.

1.4.2.2. *Συγκεντρώσεις εκθέσεως*

Μεταξύ των κριτηρίων που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν καθορίζεται η μέγιστη προς χρήση συγκέντρωση είναι η κυτταροτοξικότητα, η διαλυτότητα στο σύστημα δοκιμής και οι μεταβολές στο pH ή την οσμωμοριακότητα.

Η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να προσδιορίζεται με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση στο κύριο πείραμα χρησιμοποιώντας προς τούτο μία κατάλληλη ένδειξη της ακεραιότητας και ανάπτυξης των κυττάρων όπως ο βαθμός συρροής, ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων ή ο μιτωτικός δείκτης. Χρήσιμο μπορεί να είναι ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας και διαλυτότητας να γίνει σε ένα προκαταρκτικό πείραμα.

▼B

Για την ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις. Εφόσον εμφανίζονται φαινόμενα κυτταροτοξικότητας, οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να καλύπτουν μία περιοχή από τη μέγιστη μέχρι μικρή ή και μηδενική τοξικότητα. Λυτό σημαίνει συνήθως ότι οι συγκεντρώσεις δεν θα πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από ένα συντελεστή μεταξύ 2 και 10. Κατά το χρόνο της συλλογής, η μέγιστη συγκέντρωση θα πρέπει να εμφανίζει σημαντική μείωση στο βαθμό συρροής, τον αριθμό των κυττάρων ή το μιτωτικό δείκτη (όλα περισσότερο από 50 %). Ο μιτωτικός δείκτης αποτελεί έμμεση μόνο μέτρηση των κυτταροτοξικών/κυτταροστατικών αποτελεσμάτων και εξαρτάται από το χρόνο που μεσολάβησε από την κατεργασία. Εντούτοις, ο μιτωτικός δείκτης είναι αποδεκτός για καλλιέργειες μορφής εναιωρήματος για τις οποίες άλλες μετρήσεις τοξικότητας μπορεί να είναι άβολες και μη πρακτικές. Στοιχεία σχετικά με την κινητική του κυτταρικού κύλου, όπως ο μέσος χρόνος γενεάς (ΜΧΓ), μπορούν να χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικές πληροφορίες. Εντούτοις, ο ΜΧΓ είναι μία γενική μέση τιμή που δεν αποκαλύπτει πάντοτε την ύπαρξη καθυστερημένων υποπληθυσμών, ακόμη δε και πολύ μικρές αυξήσεις στο μέσο χρόνο γενεάς μπορούν να συνδέονται με πολύ σημαντική καθυστέρηση στο χρόνο της άριστης ανάπτυξης των εκτροπών.

Για σχετικά μη κυτταροτοξικές ουσίες, η μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι 5 μl/ml, 5 mg/ml ή 0,01 M, όποια από τις τρεις είναι χαμηλότερη.

Για σχετικά αδιάλυτες ουσίες που δεν είναι τοξικές σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, η μέγιστη χρησιμοποιούμενη δόση θα πρέπει να αντιστοιχεί σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από το όριο διαλυτότητας στο τελικό μέσο καλλιέργειας στο τέλος της περιόδου κατεργασίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. όταν φαινόμενα τοξικότητας εμφανίζονται μόνο σε υψηλότερες από τη χαμηλότερη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας) συνιστάται να διεξάγεται δοκιμή σε περισσότερες από μία συγκεντρώσεις με ορατή πτώση ιζήματος. Μπορεί να είναι χρήσιμο να εκτιμηθεί η διαλυτότητα στην αρχή και το πέρας της κατεργασίας καθώς η διαλυτότητα μπορεί να αλλάζει κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο σύστημα δοκιμής λόγω της παρουσίας κυττάρων, S9, ορού, κ.λπ. Η μέγιστη διαλυτότητα μπορεί να ανιχνευθεί με γυμνό οφθαλμό. Το ίζημα δεν πρέπει να παρεμβαίνει στην εκτίμηση αυτή.

1.4.2.3. *Αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες*

Σε κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλα θετικοί και αρνητικοί (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες, με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Όταν χρησιμοποιείται μεταβολική ενεργοποίηση, ως θετικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται ουσία που απαιτεί ενεργοποίηση για την παροχή μεταλλαξογόνου απόκρισης.

Ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται γνωστά κλαστογόνα σε επίπεδα έκθεσης που αναμένεται να δώσουν αναπαραγώγιμη και ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο που αποδεικνύει την ευαισθησία του συστήματος δοκιμής.

Οι συγκεντρώσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων στον παρατηρητή. Παραδείγματα ουσιών θετικών μαρτύρων είναι:

Κατάσταση μεταβολικής ενεργοποίησης	Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Απουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	Μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας	66-27-3	200-625-0
	Μεθανοσουλφονικός αιθυλεοτέρας	62-50-0	200-536-7

▼B

Κατάσταση μεταβολικής ενεργοποίησης	Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
	Λιθυλο νιτροζουρία	759-73-9	212-072-2
	Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6
	4-Νιτροκινολιν-N-οξείδιο	56-57-5	200-281-1
Παρουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	Βενζο[α]πυρένιο	50-32-8	200-028-5
	Κυκλοφωσφαμίδιο Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Ως θετικοί μάρτυρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες κατάλληλες ουσίες. Εφόσον υπάρχουν, θα πρέπει να εξετάζεται η δυνατότητα χρήσης ως θετικών μαρτύρων ουσιών σχετικής χημικής τάξης.

Σε κάθε συλλογή, θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, αποτελούμενοι από μόνο τον διαλύτη ή φορέα στο μέσο κατεργασίας και κατεργασμένοι με τον ίδιο τρόπο με εκείνο των καλλιεργειών της υπό δοκιμή ουσίας. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποστάντες κατεργασία μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν πρότερα στοιχεία που καταδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξιγόνα αποτελέσματα.

1.4.3. **Διαδικασία**

1.4.3.1. *Κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία*

Πολλαπλασιασμένα κύτταρα υποβάλλονται σε κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία παρουσία και απουσία συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Η κατεργασία των λεμφοκυττάρων πρέπει να αρχίζει 48 ώρες περίπου μετά τη μιγωμόνο διέγερση.

1.4.3.2. Για κάθε συγκέντρωση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται καλλιέργειες εις διπλούν, ενώ το ίδιο συνιστάται ένθερμα και για τις αρνητικές/με διαλύτη καλλιέργειες. Όταν από πρότερα υφιστάμενα στοιχεία μπορεί να αποδειχθεί ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των διπλών καλλιεργειών είναι ελάχιστη (13) (14), μπορεί να γίνει δεκτή η χρήση μιας μόνης καλλιέργειας για κάθε συγκέντρωση.

Οι αέριες ή πτητικές ουσίες πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή με κατάλληλες μεθόδους όπως π.χ. σε σφραγισμένα δοχεία καλλιεργειών (15) (16).

1.4.3.3. *Χρόνος συλλογής καλλιέργειας*

Στο πρώτο πείραμα, τα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία, με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. για 3-6 ώρες και να λαμβάνεται δείγμα έπειτα από χρονικό διάστημα που αντιστοιχεί με το 1,5 περίπου της κανονικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου μετά την έναρξη της κατεργασίας (12). Εάν το πρωτόκολλο αυτό δίνει αρνητικά αποτελέσματα, τόσο με όσο και χωρίς ενεργοποίηση, θα πρέπει να διεξάγεται μία πρόσθετη δοκιμή χωρίς ενεργοποίηση, με συνεχή κατεργασία μέχρι τη δειγματοληψία σε χρόνο που ισοδυναμεί με το 1,5 περίπου της κανονικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου. Ορισμένες ουσίες μπορεί να ανιχνεύονται ευκολότερα όταν ο χρόνος κατεργασίας/δειγματοληψίας είναι μεγαλύτερος από το 1,5 της διάρκειας του κύκλου. Τα αρνητικά αποτελέσματα με μεταβολική ενεργοποίηση πρέπει να επιβεβαιώνεται περίπτωση προς περίπτωση. Στις περιπτώσεις όπου δεν κρίνεται αναγκαία η επιβεβαίωση των αρνητικών αποτελεσμάτων, αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται.

▼B

1.4.3.4. *Προετοιμασία των χρωμοσωμάτων*

Κυτταρικές καλλιέργειες υποβάλλονται σε κατεργασία με Colcemid^{R} ή κολχικίνη για μία έως τρεις ώρες συνήθως πριν από τη συλλογή. Κάθε κυτταρική καλλιέργεια συλλέγεται και υποβάλλεται σε χωριστή επεξεργασία για την προετοιμασία των χρωμοσωμάτων. Η προετοιμασία των χρωμοσωμάτων περιλαμβάνει κατεργασία των κυττάρων με υπό-τονο διάλυμα, στερέωση και χρώση.

1.4.3.5. *Ανάλυση*

Όλες οι αντικειμενοφόροι, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, θα πρέπει να παίρνουν ένα ξεχωριστό κωδικό πριν από την εξέταση στο μικροσκόπιο. Επειδή οι διαδικασίες στερέωσης απολήγουν συχνά στη ρήξη ενός μέρους των μεταφασικών κυττάρων με απώλεια χρωμοσωμάτων, τα καταμετρούμενα κύτταρα θα πρέπει συνεπώς να περιέχουν αριθμό κεντρομεριδίων ίσο με τον υποθετικό αριθμό ± 2 για όλα τα είδη κυττάρων. Θα πρέπει να καταμετρούνται τουλάχιστον 200 καλώς ανεπτυγμένες μεταφάσεις ανά συγκέντρωση και μάρτυρα, μοιρασμένες εξίσου μεταξύ των εις διπλούν καλλιεργειών, εφόσον γίνεται. Ο αριθμός αυτός μπορεί να μειωθεί όταν παρατηρείται υψηλός αριθμός εκτροπών.

Αν και σκοπός της δοκιμής είναι να ανιχνευθούν χρωμοσωμικές δομικές εκτροπές, είναι σημαντικό το να καταγραφούν τυχόν φαινόμενα πολυπλοειδίας και ενδοαναδιπλασιασμού, εφόσον παρατηρηθούν.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η πειραματική μονάδα είναι το κύτταρο, επομένως θα πρέπει να υπολογίζεται το ποσοστό των κυττάρων με δομική ή δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Οι διάφοροι τύποι δομικών χρωμοσωμικών μεταβολών θα πρέπει να καταγράφονται με τον αριθμό και τη συχνότητα που εμφανίζονται στις πειραματικές και στις καλλιέργειες του μάρτυρα. Τα χάσματα καταγράφονται ξεχωριστά και περιλαμβάνονται στην έκθεση, γενικά όμως δεν περιλαμβάνονται στη συνολική συχνότητα εκτροπών.

Θα πρέπει επίσης να καταγράφονται και οι παράλληλες μετρήσεις κυτταροτοξικότητας για όλες τις υποβληθείσες σε κατεργασία καθώς και τις αρνητικές καλλιέργειες μάρτυρα στα κύρια πειράματα εκτροπής.

Θα πρέπει να δίνονται στοιχεία για κάθε καλλιέργεια χωριστά. Επιπλέον, όλα τα στοιχεία θα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα.

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφών θετικών αποκρίσεων. Τυχόν διφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να αποσαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές τροποποιώντας κατά προτίμηση τις πειραματικές συνθήκες. Η ανάγκη επιβεβαίωσης των αρνητικών αποτελεσμάτων έχει συζητηθεί στο σημείο 1.4.3.3. Στα επαναληπτικά πειράματα θα πρέπει να εξετάζεται η τροποποίηση των παραμέτρων της δοκιμής ώστε να καλύπτουν όλη την έκταση των εκτιμώμενων συνθηκών. Στις παραμέτρους που μπορούν να τροποποιηθούν περιλαμβάνεται το εύρος των συγκεντρώσεων και οι συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα ως θετικό υπάρχουν διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με την συγκέντρωση αύξηση ή η αναπαραγώγιμη αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές. Πρώτα θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι (3) (13). Σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα.

▼B

Τυχόν αύξηση στον αριθμό των πολυπλοειδών κυττάρων μπορεί να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να αναστέλλει τις μιτωτικές διεργασίες και να επάγει αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Τυχόν αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα μπορεί να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να εμποδίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (17) (18).

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξογόνος στο σύστημα αυτό.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν την εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστικότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από την *in vitro* δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία επάγει δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε καλλιεργημένα σωματικά κύτταρα θηλαστικών. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές σε καλλιεργημένα σωματικά κύτταρα θηλαστικών.

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι γνωστές.

Κύτταρα:

— τύπος και πηγή των κυττάρων,

— χαρακτηριστικά καρυοτύπου και καταλληλότητα του χρησιμοποιηθέντος τύπου κυττάρων,

— απουσία μυκοπλάσματος, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— πληροφορίες για τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου,

— φύλο των δωρητών αίματος, πλήρες αίμα ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα, χρησιμοποιηθέν μιτωγόνο,

— αριθμός διελεύσεων, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— μεθόδους συντήρησης της κυτταρικής καλλιέργειας, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— υποθετικός αριθμός χρωμοσωμάτων.

Συνθήκες δοκιμής:

— ταυτότητα της ουσίας αναστολής της μετάφασης, συγκέντρωση αυτής και διάρκεια έκθεσης των κυττάρων,

— αιτιολογία για την επιλογή των συγκεντρώσεων και του αριθμού των καλλιεργειών συμπεριλαμβανομένων, π.χ. στοιχείων κυταροτοξικότητας και περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— σύσταση του μέσου καλλιέργειας και συγκέντρωση (CO_2, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

▼B

— συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας,

— όγκος του φορέα και της προστεθείσας υπό δοκιμή ουσίας,

— θερμοκρασία επωάσεως,

— χρόνος επωάσεως,

— διάρκεια της κατεργασίας,

— πυκνότητα των κυττάρων στην ανακαλλιέργεια, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, συμπεριλαμβανομένων και κριτηρίων απο-δοχης,

— θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες,

— μέθοδοι προετοιμασίας των αντικειμενοφόρων,

— κριτήρια καταμέτρησης των εκτροπών,

— αριθμοί των αναλυθεισών μεταφάσεων,

— μέθοδοι για τις μετρήσεις τοξικότητας,

— κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης.

Αποτελέσματα:

— σημάδια τοξικότητας, π.χ. βαθμός συρροής, στοιχεία κυτταρικού κύκλου, αριθμός κυττάρων, μιτωτικός δείκτης,

— σημάδια καθίζησης,

— στοιχεία για το pH και την οσμωμοριακότητα του μέσου κατεργασίας, εφόσον προσδιορίστηκαν,

— ορισμός των εκτροπών, συμπεριλαμβανομένων των χασμάτων,

— αριθμός κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές και τύπο χρωμοσωμικών εκτροπών ξεχωριστά για κάθε κατεργασθείσα καλλιέργεια και καλλιέργεια-μάρτυρα,

— αλλαγές στην πλοειδία, εφόσον παρατηρήθηκαν,

— σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,

— στατιστικές αναλύσεις, εφόσον υπάρχουν,

— παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες,

— ιστορικά στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις.

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens,* Principles *and Methods for their Detection,* Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.

(2) lshidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in* Mutation *Research,* Vol. 5. Ashby, J. et al, (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427-432.

▼B

(3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C, Colman, S., Brown, B., Cannon, C, Bloom, A. D., Naka-mura, F.. Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, C. H., Resnick, M. Λ., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environs. Molec. Mutagen 10* (suppl. 10), pp. 1-175.

(4) Scott. D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., lshidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation* Res., 257. pp. 147-204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, 1. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, Mutation Res.. 26S, pp. 297-305.

(6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (198 3), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation *Res., 113*, pp. 173-215.

(8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *in Vitro,* J. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res., 37,* pp. 83-90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro,* Mutation Res., 66, pp. 277-290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclar 1254-induced S9 in *in Vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara. K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J., Pouts, J. R., Berid, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation *in Mutagenesis Testing,* Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(12) Galloway. S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, Mutation Res., *312,* pp. 241-261.

(13) Richardson. C, Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of* Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, Mutation Res., *312,* pp. 139-149.

(15) Krahn, D. P., Barsky, P. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), Gcnotoxic *Effects of Airborne Agents.* New York, Plenum, pp. 91-103.

▼B

(16) Zamora, P. O., Benson. J. M., Li, A. P. and Brooks, A. [.. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis.* 5, pp. 795-801.

(17) I.ocke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, Mutation Res.. 119. pp. 403-413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (I983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer* Res., 43, pp. 1362-1364.

▼B

B.11. **ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — *IN VIVO* ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΠΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberra-tion Test (1997).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *in vivo* δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών σε θηλαστικά χρησιμοποιείται για την ανίχνευση δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών που προκαλούνται από την υπό δοκιμή ουσία στα κύτταρα του μυελού των οστών ζώων, συνήθως τρωκτικών (1) (2) (3) (4). Οι δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές μπορεί να είναι δύο τύπων, χρωμοσωμικές ή χρωματιδικές. Τυχόν αύξηση στην πολυπλοειδία μπορεί να σημαίνει ότι μία χημική ουσία έχει τη δυνατότητα να επάγει αριθμητικές εκτροπές. Τα περισσότερα χημικά μεταλλαξιγόνα προκαλούν εκτροπές χρωματιδικού τύπου, απαντώνται όμως και εκτροπές χρωμοσωμικού τύπου. Οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και τα συναφή συμβάντα αποτελούν αίτιο πολλών γενετικών ασθενειών του ανθρώπου και υπάρχουν ουσιαστικές ενδείξεις ότι οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και τα συναφή συμβάντα που προκαλούν αλλοιώσεις σε ογκογονίδια και ογκογενή αποκαταστατικά γονίδια σωματικών κυττάρων συνδέονται με την εμφάνιση καρκίνου σε ανθρώπους και σε πειραματικά συστήματα.

Στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιούνται συνήθως τρωκτικά. Στη δοκιμή αυτή, ιστός στόχος είναι ο μυελός των οστιών επειδή παρουσιάζει έντονη αγγείωση και περιλαμβάνει κύτταρα με ταχύ κυτταρικό κύκλο που μπορούν εύκολα να απομονωθούν και να υποβληθούν σε κατεργασία. Τα υπόλοιπα είδη και ιστοί στόχοι δεν εμπίπτουν στο θέμα της παρούσας μεθόδου.

Η παρούσα δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών έχει άμεση σχέση με την εκτίμηση του κινδύνου μεταλλαξιγένεσης δεδομένου ότι επιτρέπει την εξέταση παραγόντων *in vivo* μεταβολισμού, φαρμακοκινητικής και διεργασιών επιδιόρθωσης DNA αν και οι παράγοντες αυτοί μπορεί να διαφέρουν μεταξύ ειδών και μεταξύ ιστών. Η *in vivo* δοκιμή είναι επίσης χρήσιμη για περαιτέρω διερεύνηση τυχόν μεταλλαξιγόνου δράσης που εντοπίζεται σε *in vitro* δοκιμή.

Εάν υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή ουσία, ή οι ενεργοί μεταβολίτες της, δεν φθάνει στον ιστό στόχο, δεν προσφέρεται η χρήση της παρούσας δοκιμής.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Εκτροπή χρωματιδικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη μεμονωμένων χρωματιδών ή ρήξη και επανένωση μεταξύ χρωματιδών.

Εκτροπή χρωμοσωμικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη, ή ρήξη και επανένωση, και των δύο χρωματιδών στην ίδια θέση.

Ενδοαναδιπλασιασμός: διεργασία κατά την οποία έπειτα από μία 5 φάση αντιγραφής DNA, ο πυρήνας δεν υφίσταται μίτωση αλλά ξεκινά μία νέα S φάση. Το αποτέλεσμα είναι χρωμοσώματα με 4, 8, 16, ... χρωματίδες.

Χάσμα: αχρωματική βλάβη μικρότερη από το πλάτος μιας χρωματίδης και με ελάχιστη απευθυγράμμιση της ή των χρωματιδών.

Αριθμητική εκτροπή: μεταβολή του αριθμού των χρωμοσωμάτων από τον κανονικό χαρακτηριστικό αριθμό των χρησιμοποιουμένων κυττάρων.

▼B

Πολυπλοειδία: πολλαπλάσιο του απλοειδούς χρωμοσωμικού αριθμού (η) πέραν του διπλοειδούς αριθμού (δηλαδή 3η. 4η κ.ο.κ.).

Δομική εκτροπή: μεταβολή της δομής των χρωμοσωμάτων που εντοπίζεται με παρατήρηση στο μικροσκόπιο του σταδίου της μετάφάσεως της διαίρεσης των κυττάρων και γίνεται αντιληπτή με τη μορφή απαλείψεων και θραυσμάτων, ενδοανταλλαγών ή ανταλλαγών.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Τα ζώα εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία από μία κατάλληλη οδό εκθέσεως και θυσιάζονται σε κατάλληλες χρονικές στιγμές μετά την αγωγή. Πριν από τη Ουσία, τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή με ένα παράγοντα αναστολής μεταφάσεως (π.χ. κολχικίνη ή Colcemid®). Στη συνέχεια, από τα κύτταρα του μυελού των οστών, παρασκευάζονται χρωμοσωμικά παρασκευάσματα τα οποία χρωματίζονται και τα μεταφασικά κύτταρα εξετάζονται προς εντοπισμό τυχόν χρωμοσωμικών εκτροπών.

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. **Προετοιμασίες**

1.4.1.1. *Επιλογή ζωικών ειδών*

Συνήθως χρησιμοποιούνται επίμυες, ποντικοί και κινέζικοι κρικητοί, αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και οποιοδήποτε άλλο κατάλληλο είδος θηλαστικού. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές φυλές νεαρών υγιών ενήλικων ζώων. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές στα βάρη των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου.

1.4.1.2. *Συνθήκες στέγασης και διατροφής*

Εφαρμόζονται οι γενικές συνθήκες που αναφέρονται στην γενική εισαγωγή του μέρους Β, αν και ο στόχος για την υγρασία θα πρέπει να είναι 50-60 %.

1.4.1.3. *Προετοιμασία των ζώων*

Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα χωρίζονται τυχαία σε ομάδες μαρτυρίας και αγωγής. Τα κλουβιά θα πρέπει να διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν πιθανές επιδράσεις από τη θέση των κλουβιών. Κάθε ζώο παίρνει ξεχωριστή ταυτότητα. Τα ζώα εγκλιματίζονται στις εργαστηριακές συνθήκες για πέντε τουλάχιστον ημέρες.

1.4.1.4. *Προετοιμασία των δόσεων*

Στερεές υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν να χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να χορηγούνται απευθείας ως έχουν ή αραιωμένες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα στοιχεία τα σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1. *Διαλύτης/φορέας*

Ο διαλύτης/φορέας δεν θα πρέπει να εμφανίζει τοξική δράση στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων αλλά ούτε και να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν είναι από τους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης/φορέας.

▼B

1.4.2.2. *Μάρτυρες*

Σε κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλα θετικοί και αρνητικοί (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες για κάθε φύλο. Με εξαίρεση την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία, τα ζώα στις ομάδες μαρτυρίας θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με εκείνο των ζώων στις υποβαλλόμενες σε αγωγή ομάδες.

Οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να προκαλούν δομικές εκτροπές *in vivo* σε επίπεδα έκθεσης που αναμένεται να δώσουν ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο. Οι δόσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων στον παρατηρητή. Οι θετικοί μάρτυρες μπορούν να χορηγούνται και από οδό διαφορετική από εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας και να δειγματίζονται μόνο μία φορά. Εφόσον υπάρχουν, μπορεί να εξετάζεται η χρήση θετικών μαρτύρων παρόμοιας χημικής τάξης. Παραδείγματα ουσιών θετικών μαρτύρων είναι:

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας	62-50-0	200-536-7
Αιθυλο νιτροζουρία	759-73-9	212-072-2
Μιτομυκύνη C	50-07-7	200-008-6
Κυκλοφωσφαμίδιο Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Τριαιθυλενομελαμίνη	51-18-3	200-083-5

Σε κάθε δειγματοληψία θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, υποβληθέντες σε αγωγή μόνο με διαλύτη ή φορέα αλλά με τον ίδιο κατά τα άλλα τρόπο με εκείνο των ομάδων της υπό δομική ουσίας, εκτός κι αν από προϋπάρχοντα στοιχεία για τους μάρτυρες προκύπτουν αποδεκτές διαφοροποιήσεις και συχνότητες κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές. Εάν για τους αρνητικούς μάρτυρες γίνεται μία μόνο δειγματοληψία, ο καταλληλότερος χρόνος είναι ο χρόνος της πρώτης δειγματοληψίας. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποβληθέντες σε αγωγή μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης/φορέας δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξογόνα αποτελέσματα.

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Κάθε υποβαλλόμενη σε αγωγή ομάδα και ομάδα-μάρτυρας πρέπει να περιλαμβάνει 5 τουλάχιστον προς εξέταση ζώα ανά φύλο. Εάν κατά το χρόνο της δοκιμής υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα από μελέτες στο ίδιο είδος ζώου με τη ίδια οδό έκθεσης που αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην τοξικότητα μεταξύ φύλων, αρκεί τότε η διεξαγωγή δοκιμής σε ένα μόνο φύλο. Στις περιπτώσεις όπου η έκθεση των ανθρώπων στις χημικές ουσίες εξαρτάται από το φύλο, όπως π.χ. μπορεί να συμβεί στην περίπτωση ορισμένων φαρμακευτικών παραγόντων, η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται με ζώα του αντίστοιχου φύλου.

1.5.2. **Χρονοδιάγραμμα αγωγής**

Οι υπό δοκιμή ουσίες χορηγούνται κατά προτίμηση με εφάπαξ αγωγή. Οι υπό δοκιμή ουσίες μπορούν επίσης να χορηγηθούν και διακεκομμένα, δηλαδή δύο αγωγές την ίδια ημέρα που να μην απέχουν χρονικά περισσότερο από μερικές ώρες, για να διευκολυνθεί η χορήγηση μεγάλης ποσότητας ουσίας. Άλλοι τυχόν χρησιμοποιούμενοι τρόποι αγωγής 3α πρέπει να αιτιολογούνται επιστημονικώς.

▼B

Τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την αγωγή της μίας ημέρας. Για τα τρωκτικά, ι] πρώτη δειγματοληψία γίνεται σε χρόνο που αντιστοιχεί στο 1,5 της κανονικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου (ο τελευταίος είναι κανονικά 12-18 ώρες) μετά την αγωγή. Επειδή ο απαιτούμενος χρόνος για την πρόσληψη και το μεταβολισμό της υπό δοκιμή ουσίας καθώς επίσης και η επίδρασή της στην κινητική του κυτταρικού κύκλου μπορεί να επηρεάσει τον άριστο ενδεικνυόμενο χρόνο για την ανίχνευση χρωμοσωμικής εκτροπής, συνιστάται να γίνεται μία δεύτερη δειγματοληψία 24 ώρες μετά την πρώτη. Εφόσον η χορήγηση της ουσίας γίνεται σε χρονικό διάστημα που υπερβαίνει τη μία ημέρα, η δειγματοληψία θα πρέπει να γίνεται έπειτα από χρονικό διάστημα που να αντιστοιχεί στο 1,5 της κανονικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου μετρούμενο από την τελική αγωγή.

Πριν από τη θυσία, στα ζώα εγχύεται ενδοπεριτοναϊκώς κατάλληλη δόση παράγοντα αναστολής μετάφασης (π.χ. Colcemid^{R} ή κολχικίνη). Σε κατάλληλη μεταγενέστερη χρονική στιγμή πραγματοποιείται στα ζώα δειγματοληψία. Για τους ποντικούς, η καταλληλότερη στιγμή περίπου 3-5 ώρες. ενώ για τους κινέζικους κρικητούς το διάστημα αυτό αντιστοιχεί περίπου σε 4-5 ώρες. Συλλέγονται κύτταρα από το μυελό των οστών και εξετάζονται από πλευράς χρωμοσωμικών εκτροπών.

1.5.3. **Επίπεδα δόσεων**

Εάν Εκτελεστεί δοκιμή ανεύρεσης εύρους επειδή δεν υπάρχουν κατάλληλα διαθέσιμα δεδομένα, αυτή 3α πρέπει να εκτελείται στο ίδιο εργαστήριο, με το ίδιο είδος, φυλή, φύλο κα τρόπο αγωγής που χρησιμοποιείται στην κύρια δοκιμή (5). Εφόσον υπάρχει τοξικότητα, για την πρώτη δειγματοληψία χρησιμοποιούνται τρία επίπεδα δόσεων. Τα επίπεδα αυτά δόσεων θα πρέπει να καλύπτουν μία περιοχή από τη μέγιστη μέχρι τη χαμηλή ή μηδενική τοξικότητα. Για τη μεταγενέστερη δειγματοληψία, χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί μόνο η μέγιστη δόση. Η μέγιστη δόση ορίζεται ως η δόση που παρέχει σημεία τοξικότητας τέτοια ώστε τυχόν υψηλότερα επίπεδα δόσης, με βάση τον ίδιο τρόπο χορήγησης, να αναμένεται φυσιολογικά να οδηγήσουν σε φαινόμενα θνησιμότητας. Ουσίες με ειδικές βιολογικές δράσεις σε χαμηλές μη τοξικές δόσεις (όπως ορμόνες και μιτωγόνα) μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις στα κριτήρια ρύθμισης των δόσεων και ΐ)α πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση. Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παρέχει ορισμένες ενδείξεις τοξικότητας στο μυελό των οστών (π.χ. μεγαλύτερη από 50 % μείωση στο μιτωτικό δείκτη).

1.5.4. **Δοκιμή οριακής δόσης**

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος στην οποία χρησιμοποιείται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ίδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσης. Σε δοκιμές μεγαλύτερης διάρκειας, η οριακή δόση είναι 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα για αγωγή μέχρι 14 ημέρες και 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα για αγωγή μεγαλύτερη από 14 ημέρες. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να αποτελέσει ένδειξη ότι πρέπει να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5. **Χορήγηση των δόσεων**

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται συνήθως με διασωλήνωση χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα ή κατάλληλο σωλήνα διασωλήνωσης ή με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί έκθεσης εφόσον μπορούν να αιτιολογηθούν. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με διασωλήνωση ή έγχυση εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2 ml/100 g βάρους σώματος. Αν χρησιμοποιηθούν μεγαλύτεροι όγκοι, αυτό πρέπει να αιτιολογείται. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται προσαρμόζοντας τη συγκέντρωση ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσεων.

▼B

1.5.6. **Προετοιμασία των χρωμοσωμάτων**

Αμέσως μετά τη θυσία λαμβάνεται μυελός των οστών, εκτίθεται σε υπότονο διάλυμα και στερεώνεται. Τα κύτταρα κατόπιν απλώνονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και χρωματίζονται.

1.5.7. **Ανάλυση**

Θα πρέπει να προσδιορίζεται ο μιτωτικός δείκτης ως μέτρο της κυτταροξικότητας σε 1 000 τουλάχιστον κύτταρα ανά ζώο για όλα τα υποβληθέντα σε αγωγή ζώα (συμπεριλαμβανομένων και των θετικών μαρτύρων) και τα μη υποβληθέντα σε αγωγή ζώα-αρνητικούς μάρτυρες.

Για κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον 100 κύτταρα. Ο αριθμός αυτός μπορεί να μειωθεί όταν παρατηρείται υψηλός αριθμός εκτροπών. Όλες οι αντικειμενοφόροι, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, θα πρέπει να λαμβάνουν έναν ανεξάρτητο κωδικό πριν από την εξέταση στο μικροσκόπιο. Επειδή οι διαδικασίες προετοιμασίας των αντικειμενοφόρων απολήγουν συχνά στη ρήξη ενός ποσοστού μεταφάσεων με απώλεια χρωμοσωμάτων, τα καταμετρούμενα κύτταρα θα πρέπει συνεπώς να περιέχουν έναν αριθμό κεντρομεριδίων ίσο με τον αριθμό 2η ± 2.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Θα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα επιμέρους στοιχεία για τα ζώα. Η πειραματική μονάδα είναι το ζώο. Για κάθε ζώο θα πρέπει να εκτιμάται ο αριθμός των καταμετρηθέντων κυττάρων, ο αριθμός των εκτροπών ανά κύτταρο και το ποσοστό των κυττάρων με δομική ή δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Οι διάφοροι τύποι δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών θα πρέπει να καταγράφονται με τον αριθμό και τη συχνότητά τους στις υποβληθείσες σε αγωγή ομάδες και τις ομάδες μάρτυρες. Τα χάσματα καταγράφονται ξεχωριστά και περιλαμβάνονται στην έκθεση, γενικά όμως δεν περιλαμβάνονται στη συνολική συχνότητα εκτροπών. Εφόσον δεν υπάρχουν ενδείξεις διαφοράς αποκρίσεως ανάλογα με το φύλο, τα δεδομένα από τα δύο φύλα μπορούν να συνδυάζονται για στατιστική ανάλυση.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα ως θετικό υπάρχουν διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με τη δόση αύξηση στο σχετικό αριθμό κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές ή η σαφής αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με εκτροπές σε ομάδα μίας μόνης δόσης με μία μόνη δειγματοληψία. Πρώτα θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι (6). Σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα. Τυχόν διφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να διασαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές, τροποποιώντας, κατά προτίμηση, τις πειραματικές συνθήκες.

Τυχόν αύξηση στην πολυπλοειδία μπορεί να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να επάγει αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Τυχόν αύξηση στον ενδοαναδιπλασιασμό μπορεί να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να παρεμποδίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (7) (8).

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξιγόνος στη δοκιμή αυτή.

▼B

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν την εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστικότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από την *in vivo* δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές μυελό των στο οστών των εξετασθέντων ειδών. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές στο μυελό των οστών των εξετασθέντων ειδών.

Θα πρέπει να εξετάζεται η πιθανότητα πρόσβασης της υπό δοκιμή ουσίας ή των μεταβολών της στη γενική κυκλοφορία ή ειδικότερα στον ιστό στόχο (π.χ. συστεμική τοξικότητα).

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορές, εφόσον είναι γνωστές.

Εξετασθέντα ζώα:

— χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— πηγή, συνθήκες στέγασης, δίαιτα, κ.λπ.,

— βάρος των μεμονωμένων ζώων στην έναρξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του εύρους των βαρών σώματος, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

— θετικός και αρνητικός (φορέας/διαλύτης) μάρτυρες,

— στοιχεία από τη μελέτη του εύρους, εφόσον έγινε,

— αιτιολογία της επιλογής του επιπέδου δύσεως,

— λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας.

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,

— αιτιολογία της χρησιμοποιηθείσας οδού χορήγησης,

— μέθοδοι επαλήθευσης του ότι η υπό δοκιμή ουσία έφθασε στη γενική κυκλοφορία ή στον στόχο, εφόσον συ\τρέχει περίπτωση,

— μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη δίαιτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), Εφόσον χρειάζεται,

— στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— λεπτομερής περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας,

— μέθοδοι για τις μετρήσεις της τοξικότητας,

▼B

— ταυτότητα της ουσίας αναστολής της μετάφασης, συγκέντρωση αυτής και διάρκεια της αγωγής,

— μέθοδοι προετοιμασίας αντικειμενοφόρων,

— κριτήρια καταμέτρησης των εκτροπών,

— αριθμός εξετασqέντων κυττάρων ανά ζώο,

— κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης.

Αποτελέσματα:

— σημάδια τοξικότητας,

— μιτωτικός δείκτης.

— τύπος και αριθμός εκτροπών ξεχωριστά για κάθε ζώο,

— ολικός αριθμός εκτροπών ανά ομάδα με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— αριθμός κυττάρων με εκτροπές ανά ομάδα με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— αλλαγές στην πλοειδία, εφόσον παρατηρήθηκαν,

— σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,

— στατιστικές αναλύσεις, εφόσον υπάρχουν,

— παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) μάρτυρες,

— ιστορικά στοιχεία για τους αρνητικούς (οιαλύτης/φορέας) μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλί σεις,

— τα παράλληλα στοιχεία για τους θετικούς μάρτυρες.

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach,* S. Venitt and J. M. Parry (eds.). IRL Press, Oxford, Washington D. C, 275-306.

(2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee. A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, Mutation Res. 189, 157-165.

(3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), Basic *Mutagenicity Tests,* UKEMS *Recommended Procedures. UKEMS* Sub-Committee *on* Guidelines *for Mutagenicity* Testing Report. Part 1 *revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(4) Tice, R. R. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the In Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, Mutation Res., 312, pp. 305-312.

(5) Fielder. R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.

▼B

(6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage,). R. K. (1989), Statistical Analysis of in Vivo Cytogenetic Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, D.). Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(7) Locke-Huhle, C. (198 3), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, Mutation Res. 119, pp. 403-413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, Cancer Res., 43, pp. 1363-1364.

▼B

B.12. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — IN VIVO ΔΟΚΙΜΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *in vivo* δοκιμή μικροπυρήνων σε θηλαστικά χρησιμοποιείται για την ανίχνευση βλάβης προκαλούμενης από την υπό δοκιμή ουσία στα χρωμοσώματα ή τη μιτωτική συσκευή ερυθροβλαστών με εξέταση ερυθροκυττάρων λαμβανομένων από το μυελό των οστών ή/και περιφερικά αιμοκύτταρα ζώων, συνήθως τρωκτικών.

Σκοπός της δοκιμής μικροπυρήνων είναι η αναγνώριση ουσιών που προκαλούν κυτταρογενετική βλάβη που απολήγει στο σχηματισμό μικροπυρήνων που περιέχουν λανθάνοντα χρωμοσωμικά θραύσματα ή ολόκληρα χρωμοσώματα.

Όταν ένας ερυθροβλάστης μυελού των οστών αναπτυχθεί σε πολυχρωμικό ερυθροκύτταρο, ο κύριος πυρήνας εκβάλλεται και οι μικροπυρήνες που έχουν σχηματιστεί μπορεί να παραμείνουν πίσω στο άλλως απύρηνο κυτταρόπλασμα. Η παρατήρηση των μικροπυρήνων διευκολύνεται στα κύτταρα αυτά επειδή δεν έχουν κύριο πυρήνα. Τυχόν αύξηση στη συχνότητα των περιεχόντων μικροπυρήνες πολυχρωμικών ερυθροκυττάρων στα ζώα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή αποτελεί ένδειξη προκληθείσας χρωμοσωμικής βλάβης.

Στη δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται συνήθως μυελός των οστών τρωκτικών επειδή στον ιστό αυτό παράγονται πολυχρωμικά ερυθροκύτταρα. Εξίσου αποδεκτή είναι και η μέτρηση φερόντων μικροπυρήνες άωρων (πολυχρωμικών) ερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα σε οποιοδήποτε είδος στο οποίο έχει καταδειχθεί ότι ο σπλήνας δεν μπορεί να απομακρύνει ερυθροκύτταρα που φέρουν μικροπυρήνες ή το οποίο εμφανίζει ικανή ευαισθησία στην ανίχνευση παραγόντων που προκαλούν δομικές ή αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Οι μικροπυρήνες μπορούν να διακριθούν με βάση ορισμένα κριτήρια. Στα κριτήρια αυτά περιλαμβάνεται ο εντοπισμός της παρουσίας ή απουσίας DNA κινητοχώρου ή κεντρομεριδίου στους μικροπυρήνες. Βασικό τελικό σημείο είναι η εύρεση της συχνότητας των φερόντων μικροπυρήνες άωρων (πολυχρωμικών) ερυθροκυττάρων. Ως βασικό τελικό σημείο της δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η εύρεση του αριθμού των ώριμων (ορθοχρωμικών) ερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα που περιέχουν μικροπυρήνες μεταξύ ενός δεδομένου αριθμού ώριμων ερυθροκυττάρων όταν τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή συνεχώς επί τέσσερις εβδομάδες ή περισσότερο.

Αυτή η *in vivo* δοκιμή μικροπυρήνων στα θηλαστικά έχει άμεση σχέση με την εκτίμηση του κινδύνου μεταλλαξιγένεσης δεδομένου ότι επιτρέπει την εξέταση παραγόντων του *in vivo* μεταβολισμού, της φαρμακοκινητικής και των διεργασιών επιδιόρθωσης DNA αν και αυτοί μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με το είδος, ανάλογα με τον ιστό και ανάλογα με τα γενετικά τελικά σημεία. Οι *in vivo* δοκιμές είναι επίσης χρήσιμες για την περαιτέρω διερεύνηση της μεταλλαξιγενούς δράσης που ανιχνεύεται από ένα *in vitro* σύστημα.

Εάν υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή ουσία, ή ο ενεργός μεταβολίτης της, δεν θα φθάσει στον ιστό στόχο, δεν προσφέρεται η χρήση της παρούσας δοκιμής.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Κεντρομερίδιο (κινητοχώρος): περιοχή ή περιοχές ενός χρωμοσώματος με τις οποίες τα ινίδια της ατράκτου ενώνονται κατά τη διάρκεια της διαίρεσης του κυττάρου δίνοντας τη δυνατότητα μεθοδευμένης κίνησης των θυγατρικών χρωμοσωμάτων προς τους πόλους των θυγατρικών κυττάρων.

Μικροπυρήνες: μικροί πυρήνες, διακριτοί και επιπλέον των κύριων πυρήνων των κυττάρων, που παράγονται κατά τη διάρκεια της τελόφασης της μίτωσης (μείωση) από λανθάνο\τα χρωμοσωμικά θραύσματα ή ολόκληρα χρωμοσώματα.

Ορθοχρωμικό ερυθροκύτταρο: ώριμο ερυθροκύτταρο χωρίς ριβοσώματα που διακρίνεται από τα άωρα, πολυχρω-μικά ερυθροκύτταρα μέσω επιλεκτικών για τα ριβοσώματα χρώσεων.

Πολυχρωμικό ερυθροκύτταρο: Άωρο ερυθροκύτταρο, σε ενδιάμεσο στάδιο ανάπτυξης, που περιέχει ακόμη ριβοσώματα και συνεπώς μπορεί να διακριθεί από τα ώριμα, ορθοχρωμικά ερυθροκύτταρα με χρώσεις ειδικές για τα ριβοσώματα.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ζώα εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία μέσω κατάλληλης οδού χορήγησης. Εφόσον χρησιμοποιείται μυελός των οστών, τα ζώα θυσιάζονται σε κατάλληλες χρονικές στιγμές μετά την αγωγή, εξάγεται ο μυελός των οστών και στη συνέχεια τα λαμβανόμενα παρασκευάσματα χρωματίζονται (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Όταν χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα, το *αίμα* συλλέγεται σε κατάλληλες χρονικές στιγμές μετά την αγωγή και τα λαμβανόμενα παρασκευάσματα επίστρωσης χρωματίζονται (4) (8) (9) (10). Στις δοκιμές με περιφερικό αίμα θα πρέπει να μεσολαβεί όσο το δυνατό λιγότερος χρόνος μεταξύ της τελευταίας έκθεσης και της συλλογής των κυττάρων. Τα παρασκευάσματα εξετάζονται για να διαπιστωθεί η παρουσία ή μη μικροπυρήνων.

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. **Προετοιμασίες**

1.4.1.1. *Επιλογή ζωικών ειδών*

Εφόσον για τη δοκιμή χρησιμοποιείται μυελός των οστών, συνιστάται η χρήση ποντικών ή επίμυων αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε κατάλληλο είδος θηλαστικού. Όταν χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα, συνιστάται η χρήση ποντικών. Εντούτοις, μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε κατάλληλο είδος θηλαστικού υπό την προϋπόθεση ότι είναι είδος στο οποίο ο σπλήνας δεν απομακρύνει τα φέροντα μικροπυρήνες ερυθροκύτταρα ή είδος που εμφανίζει ικανή ευαισθησία στην ανίχνευση παραγόντων που προκαλούν δομικές ή αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές φυλές νεαρών υγιών ζώων. Στην αρχή της δοκιμής, η διαφοροποίηση στα βάρη των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου.

1.4.1.2. *Συνθήκες στέγασης και διατροφής*

Εφαρμόζονται οι γενικές συνθήκες που αναφέρονται στη γενική εισαγωγή του μέρους Β, αν και ο στόχος για την υγρασία θα πρέπει να είναι 50-60 %.

▼B

1.4.1.3. *Προετοιμασία των ζώων*

Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα χωρίζονται τυχαία σε ομάδες-μάρτυρες και αγωγής. Σε κάθε ζώο δίνεται μία ξεχωριστή ταυτότητα. Τα ζώα εγκλιματίζονται στις εργαστηριακές συνθήκες για πέντε τουλάχιστον ημέρες. Τα κλουβιά θα πρέπει να διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν πιθανές επιδράσεις από τη θέση των κλουβιών.

1.4.1.4. *Προετοιμασία των δόσεων*

Στερεές υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν να χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να χορηγούνται απευθείας ως έχουν ή αραιωμένες πριν από τη χορήγηση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν στοιχεία που υπάρχουν σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1. *Διαλύτης/φορέας*

Ο διαλύτης/φορέας δεν θα πρέπει να εμφανίζει τοξική δράση στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων αλλά ούτε και να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν είναι από τους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητα του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης/φορέας.

1.4.2.2. *Μάρτυρες*

Σε κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλα θετικοί και αρνητικοί (φορέας/διαλύτης) μάρτυρες για κάθε φύλο. Με εξαίρεση την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία, τα ζώα στις ομάδες-μάρτυρες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με εκείνο των ζώων που ανήκουν στις ομάδες αγωγής.

Οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να παράγουν μικροπυρήνες *in vivo* σε επίπεδα έκθεσης που αναμένεται να δώσουν ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο. Οι δόσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμε-νοφόρων στον παρατηρητή. Οι θετικοί μάρτυρες μπορούν να χορηγούνται και από οδό διαφορετική από εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας και να δειγματίζονται μόνο μία φορά. Εφόσον υπάρχουν, μπορεί να εξετασθεί η χρήση θετικών μαρτύρων παρόμοιας χημικής τάξης. Παραδείγματα ουσιών θετικών μαρτύρων είναι:

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας	62-50-0	200-536-7
N-αιθυλο-N-νιτροζουρία	759-73-9	212-072-2
Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6
Κυκλοφωσφαμίδιο Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Τριαιθυλενομελαμίνη	51-18-3	200-083-5

▼B

Για κάθε δειγματοληψία θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, μόνο με διαλύτη ή φορέα, αλλά υποβληθέντες στην ίδια κατά τα άλλα αγωγή με εκείνη των ομάδων της υπό δοκιμή ουσίας, εκτός κι αν από προϋπάρχοντα στοιχεία για τους μάρτυρες προκύπτουν αποδεκτές διαφοροποιήσεις και συχνότητες κυττάρων με μικροπυρήνες μεταξύ των ζώων. Εάν για τους αρνητικούς μάρτυρες γίνεται μία μόνο δειγματοληψία, ο καταλληλότερος χρόνος είναι ο χρόνος της πρώτης δειγματοληψίας. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποβληθέντες σε αγωγή μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης/φορέας δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξιγόνα αποτελέσματα.

Εφόσον χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα, μπορεί επίσης να γίνει αποδεκτό ως παράλληλος αρνητικός μάρτυρας και ένα δείγμα προαγωγής, αλλά μόνο στις βραχυχρόνιες δοκιμές με περιφερικό αίμα (π.χ. 1-3 αγωγές) όταν τα προκύπτοντα στοιχεία ευρίσκονται στην αναμενόμενη βάσει ιστορικού περιοχή για το μάρτυρα.

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Κάθε υποβαλλόμενη σε αγωγή ομάδα και ομάδα-μάρτυρας πρέπει να περιλαμβάνει πέντε τουλάχιστον ζώα ανά φύλο (11). Εάν κατά το χρόνο της δοκιμής υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα από μελέτες στο ίδιο είδος ζώου με την ίδια οδό έκθεσης που αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην τοξικότητα μεταξύ φύλων, αρκεί τότε η διεξαγωγή δοκιμής σε ένα μόνο φύλο. Στις περιπτώσεις όπου η έκθεση των ανθρώπων στις χημικές ουσίες εξαρτάται από το φύλο, όπως π.χ. μπορεί να συμβεί στην περίπτωση ορισμένων φαρμακευτικών παραγόντων, η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται σε ζώα του αντίστοιχου φύλου.

1.5.2. **Χρονοδιάγραμμα αγωγής**

Δεν μπορεί να προταθεί κανένα τυποποιημένο χρονοδιάγραμμα αγωγής (δηλαδή μία, δύο ή περισσότερες αγωγές σε διαστήματα 24 ωρών). Τα δείγματα από παρατεταμένες δοσολογικές αγωγές είναι αποδεκτά εφόσον υπάρχει αποδεδειγμένο θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή αυτή ή, στην περίπτωση αρνητικής δοκιμής, εφόσον έχει αποδειχθεί η ύπαρξη τοξικότητας ή έχει χρησιμοποιηθεί η οριακή δόση και η χορήγηση συνεχίστηκε μέχρι τη στιγμή της δειγματοληψίας. Οι υπό δοκιμή ουσίες μπορούν επίσης να χορηγηθούν και σε διακεκομμένη δοσολογία, δηλαδή δύο αγωγές την ίδια ημέρα που να μην απέχουν χρονικά περισσότερο από λίγες ώρες, για να διευκολυνθεί η χορήγηση μεγάλης ποσότητας ουσίας.

Η δοκιμή μπορεί να εκτελεστεί με δύο τρόπους:

α) τα ζώα υποβάλλονται σε εφάπαξ αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία. Στην περίπτωση του μυελού των οστών λαμβάνονται δείγματα τουλάχιστον δύο φορές, ξεκινώντας το νωρίτερο 24 ώρες μετά την αγωγή, αλλά μην υπερβαίνοντας τις 48 ώρες από την αγωγή με κατάλληλα διαστήματα μεταξύ των δειγμάτων. Τυχόν λήψη δείγματος πριν από την παρέλευση 24 ωρών μετά την αγωγή θα πρέπει να αιτιολογείται. Στην περίπτωση του περιφερικού αίματος λαμβάνονται δήγματα τουλάχιστον δύο φορές, ξεκινώντας το νωρίτερο 36 ώρες μετά την αγωγή και αφήνοντας να περάσει κατάλληλο χρονικό διάστημα από την πρώτη δειγματοληψία για τη λήψη των επομένων αλλά όχι αργότερα από τις 72 ώρες. Εφόσον σε μία δειγματοληψία εντοπιστεί θετική απόκριση, δεν απαιτείται η λήψη άλλου δείγματος·

▼B

β) εφόσον γίνουν δύο ή περισσότερες ημερήσιες αγωγές (π.χ. δύο ή περισσότερες αγωγές σε διάστημα 24 ωρών), θα πρέπει να γίνει μία μόνο δειγματοληψία στο χρονικό διάστημα μεταξύ 18 και 24 ωρών μετά την τελική αγωγή για το μυελό των οστών και μία πάλι δειγματοληψία στο χρονικό διάστημα μεταξύ 36 και 48 ωρών από την τελική αγωγή για το περιφερικό αίμα (12).

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιπροσθέτως και άλλοι χρόνοι δειγματοληψίας, όταν χρειάζεται.

1.5.3. **Επίπεδα δόσεων**

Εάν εκτελεστεί δοκιμή ανεύρεσης εύρους επειδή δεν υπάρχουν κατάλληλα διαθέσιμα δεδομένα, αυτή θα πρέπει να εκτελείται στο ίδιο εργαστήριο, με το ίδιο είδος, φυλή, φύλο και τρόπο αγωγής που χρησιμοποιείται στην κύρια δοκιμή (13). Εφόσον υπάρχει τοξικότητα, για την πρώτη δειγματοληψία χρησιμοποιούνται τρία επίπεδα δόσεων. Τα επίπεδα αυτά δόσεων θα πρέπει να καλύπτουν μία περιοχή από τη μέγιστη μέχρι χαμηλή ή μηδενική τοξικότητα. Στη μεταγενέστερη δειγματοληψία, χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί μόνο η μέγιστη δόση. Η μέγιστη δόση ορίζεται ως η δόση που παρέχει σημεία τοξικότητας τέτοια ώστε τυχόν υψηλότερα επίπεδα δόσης, με βάση το ίδιο δοσολογικό καθεστώς, να αναμένεται φυσιολογικά να οδηγήσουν σε φαινόμενα θνησιμότητας. Ουσίες με ειδικές βιολογικές δράσεις σε χαμηλές μη τοξικές δόσεις (όπως ορμόνες και μιτωγόνα) μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις στα κριτήρια ρύθμισης των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση. Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παρέχει ενδείξεις τοξικότητας στο μυελό των οστών (π.χ. μείωση στο ποσοστό άωρων ερυθροκυττάρων μεταξύ πλήρων ερυθροκυττάρων στο μυελό των οστών ή το περιφερικό αίμα).

1.5.4. **Δοκιμή οριακής δόσης**

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος στην οποία εφαρμόζεται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ίδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να θεωρηθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσης. Σε μελέτες μεγαλύτερης διάρκειας, η οριακή δόση είναι 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα για αγωγή μέχρι 14 ημέρες και 1 000 mg/kg βάρους σώματος/day για αγωγή μεγαλύτερη από 14 ημέρες. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να αποτελέσει ένδειξη ότι πρέπει να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5. **Χορήγηση δόσεων**

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται συνήθως με διασωλήνωση χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα ή κατάλληλο σωλήνα διασωλήνωσης ή με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί έκθεσης εφόσον μπορούν να αιτιολογηθούν. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με διασωλήνωση ή με έγχυση εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2 ml//100 g βάρους σώματος. Αν χρησιμοποιηθούν μεγαλύτεροι όγκοι, αυτό πρέπει να αιτιολογείται. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα με υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται προσαρμόζοντας τη συγκέντρωση ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

▼B

1.5.6. **Προετοιμασία του μυελού/αίματος**

Τα κύτταρα του μυελού των οστών λαμβάνονται συνήθως από τα μηριαία οστά ή τα οστά των κνημών αμέσως μετά τη θυσία. Συνή3ως, τα κύτταρα απομακρύνονται από τα εν λόγω οστά, μορφώνονται σε παρασκευάσματα και χρωματίζονται χρησιμοποιώντας καθιερωμένες μεθόδους. Το περιφερικό αίμα λαμβάνεται από την ουραία φλέβα ή άλλο κατάλληλο αιμοφόρο αγγείο. Τα αιμοκύτταρα χρωματίζονται αμέσως υπερζωικώς (8) (9) (10) ή λαμβάνονται επιστρωμένα παρασκευάσματα και κατόπιν χρωματίζονται. Χρησιμοποιώντας μία ειδική για το DNA χρωστική [π.χ. πορτοκαλόχρουν ακριδίνης (14) ή Hoechst 33258 και pyronin-Y (15)] μπορούν να εξαλειφθούν ορισμένα από τα τεχνικά σφάλματα που προκαλούνται από τη χρήση μη ειδικής για το DNA χρωστικής. Το πλεονέκτημα αυτό δεν αποκλείει τη χρήση συμβατικών χρωστικών (π.χ. Giemsa). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και πρόσθετα συστήματα [π.χ. στήλες κυτταρίνης για την απομάκρυνση εμπύρηνων κυττάρων (16)] υπό την προϋπόθεση ότι τα συστήματα αυτά έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για την παρασκευή μικροπυρήνων στο εργαστήριο.

1.5.7. **Ανάλυση**

Η αναλογία των άωρων στο σύνολο (άωρα + ώριμα) των ερυ3ροκυττάρων προσδιορίζεται για κά3ε ζώο μετρώντας ένα σύνολο τουλάχιστον 200 ερυθροκυττάρων για το μυελό των οστών και 1 000 ερυθροκυττάρων για το περιφερικό αίμα (17). Όλες οι αντικειμενοφόροι, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, θα πρέπει να λαμβάνουν ένα διαφορετικό κωδικό πριν από την εξέταση στο μικροσκόπιο. Για τον προσδιορισμό της συχνότητας εμφάνισης άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνα καταμετρούνται τουλάχιστον 2 000 άωρα ερυθροκύτταρα ανά ζώο. Μπορούν να ληφθούν και άλλες πληροφορίες καταμετρώντας ώριμα ερυθροκύτταρα για μικροπυρήνες. Κατά την εξέταση των αντικειμενοφόρων, η αναλογία των άωρων στο σύνολο των ερυθροκυττάρων δεν θα πρέπει να είναι μικρότερη από το 20 % της τιμής του μάρτυρα. Όταν τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή συνεχώς για τέσσερις ή και περισσότερες εβδομάδες, για τη συχνότητα εμφάνισης μικροπυρήνων μπορούν να καταμετρηθούν επίσης τουλάχιστον 2 000 ώριμα ερυθροκύτταρα ανά ζώο. Ως εναλλακτικός τρόπος εκτίμησης αντί εκείνου με τα χέρια, μπορούν να γίνουν δεκτά και συστήματα αυτόματης ανάλυσης (ανάλυση εικόνας και κυτταρομετρία ροής κυτταρικών εναιωρημάτων), εφόσον υπάρχει κατάλληλη αιτιολόγηση και επικύρωση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Θα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα επιμέρους στοιχεία για κάθε ζώο. Η πειραματική μονάδα είναι το ζώο. Για κάθε εξεταζόμενο ζώο θα πρέπει να καταγράφεται χωριστά ο αριθμός των καταμετρηθέντων άωρων ερυθροκυττάρων, ο αριθμός των φερόντων μικροπυρήνες άωρων ερυθροκυττάρων και ο αριθμός των άωρων στο σύνολο των ερυθροκυττάρων. Όταν τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή συνεχώς για τέσσερις ή περισσότερες εβδομάδες, θα πρέπει επίσης να δίνονται και τα στοιχεία για τα ώριμα ερυθροκύτταρα, εφόσον ελήφθησαν. Για κάθε ζώο δίνεται η αναλογία των άωρων στο σύνολο των ερυθροκυττάρων και, εφόσον συντρέχει περίπτωση, το ποσοστό των φερόντων μικροπυρήνες ερυθροκυττάρων. Εφόσον δεν υπάρχουν ενδείξεις διαφοράς αποκρίσεως ανάλογα με το φύλο, τα δεδομένα από τα δύο φύλα μπορούν να συνδυάζονται για στατιστική ανάλυση.

▼B

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ως θετικό ένα αποτέλεσμα υπάρχουν διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με τη δόση αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με μικροπυρήνες ή η σαφής αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με μικροπυρήνες σε ομάδα μίας μόνης δόσης σε μία μόνη δειγματοληψία. Πρώτα θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι (18) (19). Σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα. Τυχόν διφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να διασαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές και τροποποιώντας, κατά προτίμηση, τις πειραματικές συνθήκες.

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξιγόνος στη δοκιμή αυτή.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν τη εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστικότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα στη δοκιμή μικροπυρήνων δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία προκαλεί την παραγωγή μικροπυρήνων που είναι αποτέλεσμα χρωμοσωμικής βλάβης ή βλάβης στη μιτωτική συσκευή στους ερυθροβλάστες του εξετασθέντος είδους. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν παράγει μικροπυρήνες στα άωρα ερυθροκύτταρα του εξετασθέντος είδους.

Θα πρέπει να εξετάζεται αν η υπό δοκιμή ουσία ή οι μεταβολίτες της έχουν τη δυνατότητα πρόσβασης στη γενική κυκλοφορία ή ειδικότερα στον ιστό στόχο (π.χ. συστεμική τοξικότητα).

3 **ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι γνωστές.

Εξετασθέντα ζώα:

— χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— πηγή, συνθήκες στέγασης, δίαιτα, κ.λπ.,

— βάρος των μεμονωμένων ζώων στην έναρξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του εύρους των βαρών σώματος, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

— θετικοί και αρνητικοί (φορέας/διαλύτης) μάρτυρες,

— στοιχεία από τη μελέτη εύρεσης του εύρους, εφόσον έγινε,

▼B

— αιτιολογία της επιλογής του επιπέδου δόσεως.

— λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας,

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,

— αιτιολογία της χρησιμοποιηθείσας οδού χορήγησης,

— μέθοδοι επαλήθευσης του ότι η υπό δοκιμή ουσία έφθασε στη γενική κυκλοφορία ή στον ιστό στόχο, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη δίαιτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον χρειάζεται,

— στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— λεπτομερής περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας,

— μέθοδοι ετοιμασίας αντικείμενοφόρων,

— μέθοδοι για τις μετρήσεις της τοξικότητας,

— κριτήρια για την καταμέτρηση των φερόντων μικροπυρήνες άωρων ερυθροκυττάρων,

— αριθμός εξετασθέντων κυττάρων ανά ζώο,

— κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης.

Αποτελέσματα:

— σημάδια τοξικότητας,

— αναλογία άωρων στο σύνολο των ερυθροκυττάρων,

— αριθμός φερόντων μικροπυρήνες άωρων ερυθροκυττάρων, χωριστά για κάθε ζώο,

— μέση τιμή ± τυπική απόκλιση των φερόντων μικροπυρήνες ερυθροκυττάρων ανά ομάδα,

— σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,

— στατιστικές αναλύσεις και εφαρμοσθείσες μέθοδοι,

— παράλληλα και προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) μάρτυρες,

— παράλληλα στοιχεία για τους θετικούς μάρτυρες.

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, Mutation *Res., 18,* pp. 187-190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, Mutation Res., 31, pp. 9-15.

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M, Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, Mutation Res. 123, pp. 61-118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C, Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., *239,* pp. 29-80.

▼B

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology,* ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp., 555-558.

(6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C, Salamone, M. F., Tice, R. R. and Wild, D. (1987). Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, Mutation Res., 1S9, pp. 103-112.

(7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *bund.* Appl. Toxicol. 14, pp. 513-522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, Mutation Res., 245, pp. 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/-JEMMS, MMS, Mutation Res., 27S, pp. 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis,* 10, pp. 153-159.

(11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo,* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.,* 312, pp. 293-304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30±6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis, 10,* pp. 313-319.

(13) Fielder, R. J., Allen,). A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In* Vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis,* 7, pp. 313-319.

(14) Hayashi, M, Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, Mutation Res., 120, pp. 241-247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and I.anglois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, Mutation Res., 120, pp. 269-275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation *Res.,* 213, pp. 91-104.

(17) Gollapudi, B. and McFaddcn, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normo-chromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res., 347,* pp. 97-99.

▼B

(18) Richold, M.. Ashby. J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. *G.* and Henderson. L. (1990). In Vivo Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic* Mutagenicity tests. *UKEMS Recommended Procedures, UKEMS* Sub-Committee *on Guidelines for* Mutagenicity Testing Report, Part I, *revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(19) Lovell, D. P., Anderson, D.. Albanese, R.. Amphlett, G. E.. Clare. G., Ferguson, R., Richold. M.. Pap-worth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In* Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity* Testing. Report. Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.13/14. **ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 471 Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης χρησιμοποιούνται στελέχη Salmonella typhimurium και Escherichia coli απαιτούντα αμινοξέα για τον εντοπισμό σημειακών μεταλλάξεων, που περιλαμβάνουν υποκατάσταση, προσθήκη ή απάλειψη ενός ή μερικών ζευγών βάσεων DNA (1) (2) (3). Η αρχή της δοκιμής αυτής της βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης συνίσταται στο ότι ανιχνεύει μεταλλάξεις που αναστρέφουν μεταλλάξεις που υπάρχουν στα υπό δοκιμή στελέχη και αποκαθιστούν τη λειτουργική ικανότητα των βακτηρίων για σύνθεση ενός βασικού αμινοξέος. Τα αναστραφέντα βακτήρια ανιχνεύονται από την ικανότητά τους να αναπτύσσονται απουσία του αμινοξέος που απαιτείται από το γονικό υπό δοκιμή στέλεχος.

Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι το αίτιο πολλών γενετικών ασθενειών στους ανθρώπους και υπάρχουν ουσιαστικές ενδείξεις ότι οι σημειακές μεταλλάξεις στα ογκογονίδια και στα ογκογενή αποκατασταστικά γονίδια σωματικών κυττάρων εμπλέκονται στη δημιουργία όγκων στους ανθρώπους και σε πειραματόζωα. Η δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης είναι ταχεία, φθηνή και σχετικά εύκολη να γίνει. Πολλά από τα υπό δοκιμή στελέχη παρουσιάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν πιο ευαίσθητα για την ανίχνευση μεταλλάξεων και στα οποία περιλαμβάνονται αποκρινόμενες ακολουθίες DNA στις θέσεις αναστροφής, αυξημένη κυτταρική διαπερατότητα στα μεγάλα μόρια και εξάλειψη των συστημάτων επιδιόρθωσης DNA ή ενίσχυση των επιρρεπών σε σφάλματα διεργασιών επιδιόρθωσης DNA. Η εξειδίκευση των υπό δοκιμή στελεχών μπορεί να παράσχει ορισμένες χρήσιμες πληροφορίες για τους τύπους μεταλλάξεων που προκαλούνται από γονοτοξικούς παράγοντες. Για τις δοκιμές βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης υπάρχει διαθέσιμη μία πολύ μεγάλη βάση δεδομένων με αποτελέσματα για μία μεγάλη ποικιλία δομών ενώ έχουν αναπτυχθεί αρκετές καθιερωμένες πλέον μεθοδολογίες για τον έλεγχο χημικών ουσιών με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων και πτητικών ενώσεων.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Η δοκιμή ανάστροφης μετάλλαξης στη Salmonella typhimurium ή στα Escherichia coli ανιχνεύει μετάλλαξη σε απαιτούν αμινοξύ στέλεχος (ιστιδίνη ή τρυπτοφάνη, αντίστοιχα) για την παραγωγή στελέχους που δεν εξαρτάται από την έξωθεν παροχή αμινοξέος.

Μεταλλαξογόνα υποκατάστασης ζευγών βάσεων είναι παράγοντες που προκαλούν αλλαγή βάσεων στο DNA. Στη δοκιμή αναστροφής η αλλαγή αυτή μπορεί να συμβεί στη θέση της αρχικής μετάλλαξης ή σε μία άλλη θέση του βακτηριακού γονιδιώματος.

Μεταλλαξογόνα αλλαγής πλαισίου είναι παράγοντες που προκαλούν την προσθήκη ή απάλειψη ενός ή περισσοτέρων ζευγών βάσεων στο DNA, μεταβάλλοντας έτσι το αναγνωστικό πλαίσιο στο RNA.

▼B

1.3. ΑΡΧΙΚΕΣ ΘΕΩΡΗΣΕΙΣ

Στη δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης χρησιμοποιούνται προκαρυωτικά κύτταρα τα οποία διαφέρουν από τα κύτταρα των θηλαστικών σε ορισμένα σημεία όπως η πρόσληψη, ο μεταβολισμός, η χρωμοσωμική δομή και οι διεργασίες επιδιόρθωσης DNA. Οι δοκιμές που πραγματοποιούνται *in vitro* απαιτούν εν γένει τη χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης. Τα *in vitro* συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μπορούν να μιμηθούν πλήρως τις *in vivo* συνθήκες στα θηλαστικά. Συνεπώς, η δοκιμή δεν παρέχει άμεσες πληροφορίες για τη μεταλλαξιγόνο και καρκινογόνο δυνατότητα μιας ουσίας στα θηλαστικά.

Η δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης χρησιμοποιείται συνήθως ως μία αρχική δοκιμή προσανατολισμού για τη γονοτοξική δραστικότητα και, ιδιαίτερα, την επάγουσα σημειακές μεταλλάξεις. Από πολυάριθμα συλλεγμένα στοιχεία καταδεικνύεται ότι πολλά χημικά που είναι θετικά στη δοκιμή αυτή εμφανίζουν μεταλλαξιγόνο δράση και σε άλλες δοκιμές. Υπάρχουν παραδείγματα μεταλλαξιγόνων παραγόντων που δεν ανιχνεύονται με τη δοκιμή αυτή. Οι ατέλειες αυτές μπορούν να αποδοθούν στην ειδική φύση του ανιχνευόμενου τελικού σημείου, στις διαφορές στη μεταβολική ενεργοποίηση ή στις διαφορές στη βιοδιιιθεσιμότητα. Από την άλλη μεριά, παράγοντες που ενισχύουν την ευαισθησία της δοκιμής βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης μπορούν να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση της μεταλλαξιγόνου δραστικότητας.

Η δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης μπορεί να μη προσφέρεται για την αξιολόγηση ορισμένων τάξεων χημικών ουσιών όπως, π.χ., για ισχυρά βακτηριοκτόνες ενώσεις (π.χ. ορισμένα αντιβιωτικά) και ενώσεις που θεωρείται (ή είναι γνωστό) ότι παρεμβαίνουν ειδικά στο σύστημα κυτταρικής αντιγραφής των θηλαστικών (π.χ. ορισμένοι αναστολείς της τοποϊσομεράσης και ορισμένα νουκλεοτιδικά ανάλογα). Για τις περιπτώσεις αυτές, μπορεί να προσφέρονται περισσότερο οι δοκιμές μετάλλαξης στα θηλαστικά.

Αν και πολλές ενώσεις που είναι θετικές στη δοκιμή αυτή είναι καρκινογόνες στα θηλαστικά, ο συσχετισμός αυτός δεν είναι απόλυτος. Εξαρτάται από την τάξη της χημικής ένωσης και υπάρχουν καρκινογόνα που δεν ανιχνεύονται με τη δοκιμή αυτή επειδή δρουν μέσω άλλων, μη γονοτοξικών, μηχανισμών ή μηχανισμών που δεν υφίστανται στα βακτηριακά κύτταρα.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εναιωρήματα βακτηριακών κυττάρων εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία παρουσία και απουσία εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Στη μέθοδο προσθήκης σε τρυβλίο, τα εναιωρήματα αυτά αναμειγνύονται με άγαρ επικάλυψης και επιστρώνονται αμέσως σε ελάχιστη ποσότητα θρεπτικού μέσου. Στη μέθοδο προεπωάσεως, το μίγμα κατεργασίας επωάζεται και κατόπιν αναμειγνύεται με άγαρ επιστρώσεως πριν επιστρωθεί σε ελάχιστη ποσότητα μέσου. Και στις δύο τεχνικές, έπειτα από δύο ή τρεις ημέρες επωάσεως, μετρώνται οι ανάστροφες αποικίες και ο αριθμός τους συγκρίνεται με τον αριθμό των αυθόρμητων ανάστροφων αποικιών σε τρυβλία-μάρτυρες με διαλύτη.

Έχουν περιγραφεί διάφορες διαδικασίες για την εκτέλεση της δοκιμής βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης. Μεταξύ εκείνων που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η μέθοδος προσθήκης σε τρυβλίο (1) (2) (3) (4), η μέθοδος προεπωάσεως (2) (3) (5) (6) (7) (8), η μέθοδος διακύμανσης (9) (10) και η μέθοδος εναιωρήματος (11). Έχουν περιγραφεί επίσης και τροποποιήσεις για τη δοκιμασία αερίων η ατμών (12).

▼B

Οι διαδικασίες που περιγράφονται στη μέθοδο σχετίζονται κυρίως με τις μεθόδους προσθήκης σε τρυβλίο και προεπωάσεως. Και οι δύο είναι αποδεκτές για την πραγματοποίηση πειραμάτων και με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Ορισμένες ουσίες μπορούν να ανιχνευθούν αποτελεσματικότερα με τη μέθοδο προεπωάσεως. Οι ουσίες αυτές ανήκουν σε μία σειρά χημικών τάξεων στην οποία περιλαμβάνονται οι αλειφατικές νιτροζαμίνες με βραχεία αλυσίδα, τα δισθενή μέταλλα, αλδεΰδες, αζωχρώματα και διαζωενώσεις, πυρολλιζιδινικά αλκαλοειδή, αλλυλοενώσεις και νιτροενώσεις (3). Αναγνωρίζεται επίσης ότι ορισμένες τάξεις μεταλλαξιγόνων δεν ανιχνεύονται πάντοτε με τις τυποποιημένες διαδικασίες όπως με τη μέθοδο προσθήκης σε τρυβλίο ή με τη μέθοδο προεπωάσεως. Αυτές θα πρέπει να θεωρούνται ως «ειδικές περιπτώσεις» και συνιστάται ιδιαίτερα να χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους εναλλακτικές διαδικασίες. Ως «ειδικές περιπτώσεις» μπορούν να αναφερθούν οι ακόλουθες (μαζί με παραδείγματα διαδικασιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευσή τους): αζωχρώματα και διαζωενώσεις (3) (5) (6) (13), αέρια και πτητικές ουσίες (12) (14) (15) (16) και γλυκοζίτες (17) (18). Τυχόν παρέκκλιση από την τυποποιημένη διαδικασία πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικώς.

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1. **Προετοιμασίες**

1.5.1.1. *Βακτήρια*

Πρόσφατες καλλιέργειες βακτηρίων θα πρέπει να αφήνονται να αναπτυχθούν μέχρι το τελευταίο στάδιο της εκθετικής ή το πρώιμο στάδιο της στατικής φάσης αναπτύξεως (περίπου 10^9 κύτταρα ανά ml). Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται καλλιέργειες που βρίσκονται στο τελευταίο στάδιο της στατικής φάσης. Παίζει σημαντικό ρόλο οι χρησιμοποιούμενες καλλιέργειες να εμφανίζουν υψηλό τίτλο βιώσιμων βακτηρίων. Ο τίτλος μπορεί να βρεθεί είτε από προϋπάρχοντα στοιχεία για τις καμπύλες αύξησης, είτε σε κάθε δοκιμή με τον προσδιορισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων με δοκιμή σε τρυβλίο.

Η συνιστώμενη θερμοκρασία επωάσεως είναι 37 °C.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πέντε τουλάχιστον στελέχη βακτηρίων. Σε αυτά θα πρέπει να περιλαμβάνονται τέσσερα στελέχη .8. typhimurium (TA 1535, TA 1537 ή TA97a ή TA97, TA98 και TA100) που έχει αποδειχθεί ότι είναι αξιόπιστα και παρέχουν αναπαραγώγιμες αποκρίσεις μεταξύ εργαστηρίων. Τα τέσσερα αυτά στελέχη S. typhimurium έχουν GC ζεύγη βάσεων στην πρωταρχική θέση αναστροφής και είναι γνωστό ότι δεν μπορούν να εντοπίσουν ορισμένα οξειδωτικά μεταλλαξιγόνα, παράγοντες σταυροειδούς σύνδεσης και υδραζίνες. Οι ουσίες αυτές μπορούν να ανιχνευθούν με στελέχη E. coli WP2 ή S. typhimurium TA102 (19) που έχουν ένα ζεύγος βάσεων AT στην πρωταρχική θέση αναστροφής. Συνεπώς, ο συνιστώμενος συνδυασμός στελεχών είναι:

— S. typhimurium TA153 5 και

— S. typhimurium TA1537 ή TA97 ή TA97a και

— S. typhimurium TA98 και

— S. typhimurium TA100 και

— E. coli WP2 uvrA ή E. coli WP2 uvrA (pKM 101) ή S. typhimurium TA102.

Για να ανιχνευθούν μεταλλαξιγόνα σταυροειδούς σύνδεσης μπορεί να είναι σκόπιμο να περιληφθεί TA102 ή να προστεθεί ένα ειδικό για την επιδιόρθρωση DNA στέλεχος E. coli [π.χ. E. coli YVP2 ή E. coli WP2 (pKM101)].

▼B

Για την παρασκευή έτοιμων καλλιεργειών, την επαλήθευση ιχνηθετών και την αποθήκευση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται καθιερωμένες διαδικασίες. Για κάθε κατεψυγμένο παρασκεύασμα έτοιμης καλλιέργειας θα πρέπει να καταδεικνύεται ότι απαιτεί αμινοξύ για να αναπτυχθεί (ιστιδΐνη για στελέχη S. typhimurium και θρυπτοφάνη για στελέχη E. coli). Θα πρέπει ομοίως να ελέγχονται προς επιβεβαίωση και άλλα ψαινοτυπικά χαρακτηριστικά, συγκεκριμένα: η παρουσία ή απουσία πλασμιδίων R-παράγοντα όπου χρειάζεται [δηλαδή αντίσταση αμπικιλλίνης σε στελέχη TA98, TA 100 και TA97a ή TA97, VVP2 uvrA και WP2 uvrA (pKM101), και αντίσταση αμπικιλλίνης + τετρακυκλίνης σε στέλεχος TA 102], η παρουσία χαρακτηριστικών μεταλλάξεων (δηλαδή rfa μετάλλαξη σε S. typhimurium μέσω της ευαισθησίας σε κρυσταλλικό ιώδες και uvrAμετάλλαξη σε E. coli ή uvrB μετάλλαξη σε S. typhimurium μέσω της ευαισθησίας σε υπεριώδες φως} (2} (3}. Τα στελέχη θα πρέπει επίσης να δίνουν έναν αριθμό αυθόρμητων ανάστροφων αποικιών σε τρυβλίο που να πέφτει μέσα στις περιοχές συχνοτήτων που αναμένονται από τα προϋπάρχοντα εργαστηριακά δεδομένα, και κατά προτίμηση, μέσα στην περιοχή που αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

1.5.1.2. *Θρεπτικό μέσο*

Χρησιμοποιείται κατάλληλο ελάχιστο άγαρ (π.χ. άγαρ που περιέχει ελάχιστο μέσο E Vogel-Bonner και γλυκόζη) και άγαρ επίστρωσης που περιέχει ιστιδίνη και βιοτίνη ή τρυπτοφάνη για να μπορούν να γίνουν μερικές κυτταρικές διαιρέσεις (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Μεταβολική ενεργοποίηση*

Τα βακτήρια θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία παρουσία και απουσία κατάλληλου συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (S9) που παρασκευάζεται από το ήπαρ τρωκτικών που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες όπως το Aroclor 1254 (1) (2) ή μείγμα φαινοβαρβιτόνης και β-ναφθοφλαβόνης (18) (20) (21). Το μεταμιτοχονδριακό κλάσμα χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 5 έως 30 % ν/ν στο S9—μείγμα. Η επιλογή και κατάσταση ενός συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης μπορεί να εξαρτάται από την τάξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία συγκεντρώσεις μεταμιτοχονδριακού κλάσματος. Στην περίπτωση των αζωχρωμάτων και των αζωενώσεων, μπορεί να είναι καλύτερα να χρησιμοποιηθεί αναγωγικό σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης (6) (13).

1.5.1.4. *Υπό δοκιμή ουσία/προετοιμασία*

Οι στερεές υπό δοκιμή ουσίες πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται εφόσον απαιτείται πριν από την κατεργασία των βακτηρίων. Οι υγρές ουσίες μπορούν να προστίθενται απευθείας στα συστήματα δοκιμής ή/και να αραιώνονται πριν από την κατεργασία. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας στοιχεία επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

Δεν πρέπει να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδραση του διαλύτη/φορέα με την υπό δοκιμή ουσία ενώ θα πρέπει να είναι συμβατός με την επιβίωση των βακτηρίων και τη δραστικότητα S9 (22). Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν ανήκει στους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατέ), να εξετάζεται πρώτα η χρήση ενός υδατικού διαλύτη/φορέα. Όταν εξετάζονται ουσίες που δεν είναι σταθερές στο νερό, οι χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες θα πρέπει να είναι απαλλαγμένοι ύδατος.

▼B

1.5.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.5.2.1. *Υπό δοκιμή στελέχη (βλέπε σημείο 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Συγκέντρωση εκθέσεως*

Μεταξύ των κριτηρίων που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον καθορισμό της μέγιστης για χρήση ποσότητας υπό δοκιμή ουσίας είναι η κυτταροτοξικότητα και η διαλυτότητα στο τελικό μίγμα κατεργασίας.

Μπορεί να είναι σκόπιμο να προσδιοριστεί η τοξικότητα και η δυσδιαλυτότητα με μία προκαταρκτική δοκιμή. Η κυτ-ταροτοξικότητα μπορεί να βρεθεί από τη μείωση του αριθμού των ανάστροφων αποικιών, το μηδενισμό ή την ελάττωση του υποστρώματος ή το βαθμό επιβίωσης των εξεταζομένων καλλιεργειών. Η κυτταροτοξικότητα μιας ουσίας μπορεί να μεταβληθεί παρουσία συστημάτων μεταβολικής ενεργοποίησης. Η δυσδιαλυτότητα θα πρέπει να εκτιμάται με βάση την πτώση ιζήματος στο τελικό μίγμα υπό τις πραγματικές συνθήκες δοκιμής που είναι εμφανής με γυμνό οφθαλμό.

Η συνιστώμενη μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής για διαλυτές μη κυτταροτοξικές ουσίες είναι 5 mg/τρυβλίο ή 5 ml/τρυβλίο. Για μη κυτταροτοξικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε επίπεδα συγκεντρώσεως 5 mg/τρυβλίο ή 5 ml/τρυβλίο, μία ή περισσότερες από τις χρησιμοποιούμενες στη δοκιμή συγκεντρώσεις θα πρέπει να καθιστούν την ουσία αδιάλυτη στο τελικό μίγμα κατεργασίας. Οι υπό δοκιμή ουσίες που είναι κυτταροτοξικές ήδη από επίπεδα συγκεντρώσεως κάτω των 5 mg/τρυβλίο ή 5 ml/τρυβλίο θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή μέχρι του επιπέδου της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης. Το ίζημα δεν θα πρέπει να παρεμβαίνει στην εκτίμηση.

Στα αρχικά πειράματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε διαφορετικές αναλώσιμες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας με ημιλογαριθμικά περίπου διαστήματα (δηλαδή 10) μεταξύ των σημείων δοκιμής. Όταν διερευνάται η σχέση συγκέντρωσης/απόκρισης, μπορεί να είναι σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν μικρότερα διαστήματα. Όταν αξιολογούνται ουσίες που περιέχουν σημαντικές ποσότητες δυνητικά μεταλλαξιγόνων προσμείξεων, μπορεί να εξεταστεί και η διενέργεια δοκιμής σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τα 5 mg/τρυβλίο ή 5 ml/τρυβλίο.

1.5.2.3. *Αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες*

Σε κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλα και καλλιέργειες με εξειδικευμένους για το στέλεχος θετικούς και αρνητικούς (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες. Θα πρέπει να επιλέγονται συγκεντρώσεις θετικών μαρτύρων που αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα κάθε δοκιμής.

Σε δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιείται σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης, ο ή οι θετικοί μάρτυρες αναφοράς θα πρέπει να επιλέγονται με βάση το είδος των χρησιμοποιουμένων βακτηριακών στελεχών.

Παραδείγματα κατάλληλων θετικών μαρτύρων για δοκιμές με μεταβολική ενεργοποίηση αποτελούν οι παρακάτω ουσίες:

Ουσια	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
9,10-διμεθυλανθρακένιο	781-43-1	212-308-4
7,12-διμεθυλοβενζ[α]ανθρακένιο	57-97-6	200-359-5
βενζο[α]πυρένιο	50-32-8	200-028-5
2-αμινοανθρακένιο	613-13-8	210-330-9

▼B

Ουσια	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0	200-015-4
Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	6055-19-2	

Η ακόλουθη ουσία είναι ένας κατάλληλος Οπτικός μάρτυρας για τη μέθοδο αναγωγικής μεταβολικής ενεργοποίησης:

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Ερυθρό του Κονγκό	573-58-0	209-358-4

Το 2-αμινοανθρακένιο δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως αποκλειστικός δείκτης της αποτελεσματικότητας του S9-Μείγματος. Εάν χρησιμοποιηθεί 2-αμινοανθρακένιο, κάθε παρτίδα S9 θα πρέπει να χαρακτηρίζεται και με ένα μεταλλαξιγόνο που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση από μικροσωμικά ένζυμα, π.χ. βενζο[α]πυρένιο, διμεθυλοβενζανθρακένιο.

Οι ουσίες που ακολουθούν αποτελούν παραδείγματα εξειδικευμένων κατά στέλεχος θετικών μαρτύρων για δοκιμές που εκτελούνται χωρίς εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης:

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS	Στέλεχος
Αζίδιο του νατρίου	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 και TA 100
2-νιτροφθορένιο	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-αμινοακριδίνη	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 και TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 και TA 97a
Υδροπεροξείδιο του κουμενίου	80-15-9	201-254-7	TA 102
Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA και TA 102
N-αιθυλο-N-νιτρο-N-νιτροζο-γουανιδίνη	70-25-7	200-730-1	YVP2, \VP2uvrA και WP2uvrA(pKM101)
4-νιτροκινολιν-1 -οξείδιο	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA και WP2uvrA(pKM101)
Φουρυλοφουραμίδιο (AF2)	3688-53-7		Στελέχη περιέχονται πλασμίδιο

Ως θετικοί μάρτυρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες κατάλληλες ουσίες αναφοράς. Εφόσον υπάρχουν, θα πρέπει να εξετάζεται η δυνατότητα χρήσης ως θετικών μαρτύρων ουσιών σχετικής χημικής τάξης.

Θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, αποτελούμενοι από μόνο τον διαλύτη ή φορέα στο μέσο, χωρίς την υπό δοκιμή ουσία, και υποβαλλόμενοι στην ίδια κατεργασία με εκείνη των υπό δοκιμή καλλιεργειών, Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποβληθέντες σε κατεργασία μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν πρότερα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξιγόνα αποτελέσματα.

▼B

1.3.3. **Διαδικασία**

Στη μέθοδο της προσθήκης σε τρυβλίο (1) (2) (3) (4), χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, αναμειγνύονται συνήθως 0,05 ml ή 0,1 ml των διαλυμάτων δοκιμής, 0,1 ml πρόσφατης βακτηριακής καλλιέργειας (που περιέχει περίπου 10^8 βιώσιμα κύτταρα) και 0,5 ml στείρου ρυθμιστικού διαλύματος με 2,0 ml άγαρ επιστρώσεως. Στη δοκιμή με μεταβολική ενεργοποίηση, αναμειγνύονται συνήθως 0,5 ml μίγματος μεταβολικής ενεργοποίησης που περιέχει κατάλληλη ποσότητα μεταμιτοχονδριακού κλάσματος (της τάξεως του 5 έως 30 % v/v στο μείγμα μεταβολικής ενεργοποίησης) με το άγαρ επιστρώσεως (2,0 ml), μαζί με τα βακτήρια και την ουσία δοκιμής/διάλυμα δοκιμής. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα ανακατεύεται και φέρεται στην επιφάνεια τρυβλίου με ελάχιστο άγαρ. Το άγαρ επιστρώσεως αφήνεται να στερεοποιηθεί πριν από την επώαση.

Στη μέθοδο της προεπωάσεως (2) (3) (5) (6), η ουσία δοκιμής/διάλυμα δοκιμής προεπωάζεται με το υπό δοκιμή στέλεχος (που περιέχει περίπου 10^8 βιώσιμα κύτταρα) και στείρο ρυθμιστικό διάλυμα ή το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης (0,5 ml) συνήθως για 20 λεπτά ή και περισσότερο στους 30-37 °C πριν να αναμειχθεί με το άγαρ επιστρώσεως και να επιστρωθεί στην επιφάνεια τρυβλίου με ελάχιστο άγαρ. Συνήθως, 0,05 ή 0,1 ml της υπό δοκιμή ουσίας/διαλύματος δοκιμής, 0,1 ml βακτηρίων και 0,5 ml S9-μείγματος ή στείρου ρυθμιστικού αναμειγνύονται με 2,0 ml άγαρ επιστρώσεως. Οι σωλήνες, κατά τη διάρκεια της προεπώασης, θα πρέπει να αερίζονται με τη χρήση αναταρακτη.

Για τη σωστή εκτίμηση της διακύμανσης, σε κάθε επίπεδο δύσεως θα πρέπει να χρησιμοποιείται τριπλή επίστρωση. Εφόσον αιτιολογείται επιστημονικώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και διπλή επίστρωση. Τυχαία απώλεια τρυβλίου δεν καθιστά κατ' ανάγκη άκυρη τη δοκιμή.

Αέριες ή πτητικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή με κατάλληλες μεθόδους, όπως π.χ. σε σφραγισμένα δοχεία (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Επώαση**

Όλα τα τρυβλία σε μία δεδομένη δοκιμή 9α πρέπει να επωάζονται στους 37 °C για 48-72 ώρες. Μετά την περίοδο επώασης, μετράται ο αριθμός των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα δεδομένα θα πρέπει να παρουσιάζονται ως ο αριθμός των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο. Θα πρέπει επίσης να δίνεται και ο αριθμός των ανάστροφων αποικιών στα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός (διαλύτης-μάρτυρας και μη υποβληθείς σε κατεργασία μάρτυρας, εφόσον χρησιμοποιείται) και θετικός μάρτυρας. Για την υπό δοκιμή ουσία καθώς και για το θετικό και αρνητικό (μη κατεργασθείς ή/και διαλύτης) μάρτυρα θα πρέπει να δίνονται στοιχεία με τους επιμέρους κατά τρυβλίο αριθμούς, το μέσο αριθμό των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο και την τυπική απόκλιση.

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφών θετικών αποκρίσεων. Τυχόν διφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να αποσαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές τροποποιώντας κατά προτίμηση τις πειραματικές συνθήκες. Τα αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται κατά περίπτωση. Στις περιπτώσεις όπου δεν θεωρείται αναγκαία η επιβεβαίωση των αρνητικών αποτελεσμάτων, θα πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση. Στα επαναληπτικά πειράματα θα πρέπει να εξετάζεται η τροποποίηση των παραμέτρων της δοκιμής ώστε να καλύπτουν όλη την έκταση των εκτιμώμενων συνθηκών. Στις παραμέτρους που μπορούν να τροποποιηθούν περιλαμβάνεται το εύρος της συγκέντρωσης, η μέθοδος κατεργασίας (προσθήκη σε τρυβλίο ή προεπώαση σε υγρό περιβάλλον) και οι συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης.

▼B

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα ως θετικό εφαρμόζονται διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με την συγκέντρωση αύξηση στην περιοχή δοκιμής ή/και μία αναπαραγώγιμη αύξηση υπό μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις στον αριθμό των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο σε ένα τουλάχιστον στέλεχος με ή χωρίς σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης (23). Θα πρέπει να εξετάζεται πρώτα η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι (24). Εντούτοις, σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα.

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξιγόνος στο σύστημα αυτό.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν την εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστικότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από τη δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία επάγει σημειακές μεταλλάξεις με υποκαταστάσεις βάσεων ή αλλαγές πλαισίου στο γονιδίωμα της Salmonella typhimurium ή/και Escherichia coli. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι μεταλλαξιγόνος στο εξεταζόμενο είδος.

3. **ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι γνωστές.

Στελέχη:

— χρησιμοποιηθέντα στελέχη,

— αριθμός κυττάρων ανά καλλιέργεια,

— χαρακτηριστικά των στελεχών.

Συνθήκες δοκιμής:

— ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας ανά τρυβλίο (mg/τρυβλίο ή μl/τρυβλίο) με αιτιολόγηση της επιλογής της δόσεως και του αριθμού των τρυβλίων ανά συγκέντρωση,

— χρησιμοποιηθέν θρεπτικό μέσο,

— τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, συμπεριλαμβανομένων και των κριτηρίων αποδοχής,

— διαδικασίες κατεργασίας.

Αποτελέσματα:

— σημάδια τοξικότητας.

— σημάδια καθίζησης,

— επιμέρους κατά τρυβλίο αποτελέσματα μετρήσεων,

▼B

— μέσος αριθμός των ανάστροφων άποικων ανά τρυβλίο και τυπική απόκλιση,

— σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,

— στατιστικές αναλύσεις, εφόσον υπάρχουν,

— παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες, με ευρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— Προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις.

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Ames, B. N., McCann,]. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsomc Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res*., 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L, Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick, D.)., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann,]., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The Salmonella typhimurium/Mam-malian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res.. 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters.* 1. pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: Short-term Test *Systems for Detecting Carcinogens,* ed. Nor-poth K. H. and Garner, R. C., Springer. Bertin-Heidclberg-Ncw York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse. D. G., Rowland, 1. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic* Mutageniciry Tests: UKEMS *Part 1 Revised, e*d. D.). Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, J. Food *Safety, 8.* pp. 167-1 7 7.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations* Res., *38,* pp. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L, Gatehouse, D. and J. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity* Test *Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella *typhimurium, Environmental Mutagenesis,* 3, pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, pp. 335-344.

(13) Prival, M.)., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.,* 19, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic* Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, 1. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis. 9,* pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salomonella typhimurium. Cancer Res.,* 39, pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77,* pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.). and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, Mutagenesis, 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis *Testing,* eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot. B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D, G., Gibson, G. G., Mackay,). M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res., 88, pp. 343-350.

(23) Claxton. L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, pp. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical* Evaluation *of* Mutagenicity *Test Data,* ed. Kirkland, D.)., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼B

B.15. **ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Μια ποικιλία απλοειδών και διπλοειδών στελεχών του μύκη Saccharomyces cercvisiae μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της παραγωγής των μεταλλάξεων γονιδίων που προκαλούνται με χημικά μέσα, με μεταβολική ενεργοποίηση και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση.

Έχουν χρησιμοποιηθεί συστήματα πρόσω μετάλλαξης σε απλοειδή στελέχη, όπως είναι η μέτρηση της μετάλλαξης από ερυθρά μεταλλαχθέντα στελέχη που απαιτούν αδενίνη (ade-l, ade-2), σε λευκά μεταλλαχθέντα στελέχη που απαιτούν διπλή αδενίνη καθώς και επιλεκτικά συστήματα, όπως είναι η επαγωγή αντίστασης σε καναβανίνη και κυκλοεξιμίδιο.

Το ευρύτερα επιβεβαιωμένο σύστημα αντίστροφης μετάλλαξης περιλαμβάνει χρήση του απλοειδούς στελέχους XV 185-14 C, το οποίο μεταφέρει τις ασυνθετικές μεταλλάξεις ochre-ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 και lrp 5-48, που είναι αντιστρέψιμες από μεταλλαξιογόνα υποκατάστασης βάσης, τα οποία προκαλούν ειδικές μεταλλάξεις θέσεων ή μεταλλάξεις αναστολέα ώχρας. Το XV 185-14 C φέρει επίσης τον δείκτη his 1-7, μία δυσυνθετική μετάλλαξη που ανιστρέφεται κυρίως από μεταλλάξεις δεύτερης θέσης, και τον δείκτη horn 3-10, ο οποίος αντιστρέφεται από μεταλλαξιογόνα μετατόπισης πλαισίου.

Στα διπλοειδή στελέχη του Saccharomyces cerevisiac, το μόνο ευρέως χρησιμοποιούμενο στέλεχος είναι το D_7, το οποίο είναι ομόζυγο ως προς το ilv 1-92.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

Πρέπει να παρασκευαστούν διαλύματα των δοκιμαζόμενων χημικών ουσιών και των ουσιών ελέγχου ή αναφοράς λίγο πριν από τη δοκιμασία, με τη χρήση κατάλληλου φορέα. Για υδρόφωβες οργανικές ενώσεις πρέπει να χρησιμοποιηθεί διάλυμα μέχρι 2 % κατ' όγκο σε οργανικούς διαλύτες όπως η αιθανόλη, η ακετόνη και το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

▼B

Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα πρέπει να εκτεθούν στις δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες, τόσα με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης. Το περισσότερο χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα συνεργό μεταμιτοχονδριακό κλάσμα από το ήπαρ τρωκτικών που έχουν υποστεί προηγούμενα αγωγή με παράγοντες που επάγουν ένζυμα. Η χρήση άλλων ειδών, οργανισμών, ιστών, μεταμιτοχονδριακών κλασμάτων ή διαδικασιών μπορεί επίσης να είναι κατάλληλη για μεταβολική ενεργοποίηση.

Συνθήκες δοκιμασίας

Στελέχη δοκιμασιών

Το απλοειδές στέλεχος XV 185-14 C και το διπλοειδές στέλεχος D_7 είναι τα στελέχη που χρησιμοποιούνται περισσότερο σε μελέτες σημειακής μετάλλαξης. Άλλα στελέχη μπορούν επίσης να είναι κατάλληλα.

Μέσον καλλιέργειας

Προσφυές μέσον καλλιέργειας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επιβίωσης κυττάρων και του αριθμού των μεταλλαχθέντων στελεχών.

Χρήση αρνητικών και θετικών ελέγχων

Εκτελούνται συγχρόνως με τη δοκιμασία θετικοί έλεγχοι, έλεγχοι χωρίς προηγούμενη αγωγή και έλεγχοι διαλυτών, Χρησιμοποιούνται κατάλληλες χημικές ουσίες θετικού ελέγχου για κάθε ειδικό τελικό σημείο μετάλλαξης.

Συγκέντρωση έκθεσης

Χρησιμοποιούνται πέντε τουλάχιστον κατάλληλα κατανεμημένες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Για τοξικές ουσίες, η υψηλότερη δοκιμαζόμενη συγκέντρωση δεν πρέπει να μειώνει την επιβίωση κάτω από 5 έως 10 %. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ουσίες δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους, με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για τις πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση καθορίζεται κατά περίπτωση.

Συνθήκες επώασης

Οι καλλιέργειες μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο επωάζονται τέσσερις έως επτά ημέρες σε θερμοκρασία 28 έως 30 ºC σε συνθήκες σκότους.

Συχνότητες αυθόρμητης μετάλλαξης

Πρέπει να χρησιμοποιούνται υποκαλλιέργειες με συχνότητες αυθόρμητης μετάλλαξης μέσα στα αποδεκτά κανονικά πλαίσια.

▼B

Αριθμός επαναλήψεων

Τρεις τουλάχιστον διπλές καλλιέργειες πρέπει να χρησιμοποιούνται για κάθε συγκέντρωση για τη δοκιμασία των πρωτοτροφικών στελεχών που παράγονται από τη μετάλλαξη γονιδίων και για τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Στην περίπτωση πειραμάτων με τη χρήση δεικτών, όπως είναι ο horn 3-10 με χαμηλό ρυθμό μετάλλαξης, ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων καλλιεργειών μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο πρέπει να αυξηθεί για να δώσει αποτελέσματα σημαντικά από στατιστική άποψη.

Διαδικασία

Η κατεργασία των στελεχών του Saccharomyces cerevisiae γίνεται συνήθως με διαδικασία υγρού θρεπτικού υλικού που περιλαμβάνει στάσιμα ή βλαστάνοντα κύτταρα. Προκαταρκτικά πειράματα πρέπει να γίνονται σε βλαστάνοντα κύτταρα: 1 - 5 × 10^7 κύτταρα/ml εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία μέχρι 18 ώρες σε θερμοκρασία 28 έως 37 ºC, με ανάδευση. Προστίθεται επαρκής ποσότητα μικροσωμικού κλάσματος κατά τη διάρκεια της κατεργασίας, όταν επιβάλλεται. Στο τέλος της κατεργασίας, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται, πλένονται και εμφυτεύονται σε κατάλληλο υλικό καλλιέργειας.

Μετά την επώαση, οι καλλιέργειες μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο καταμετρούνται για τον προσδιορισμό της επιβίωση και της προκληθείσης μετάλλαξη γονιδίων.

Εάν το πρώτο πείραμα είναι αρνητικό, ένα δεύτερο πείραμα πρέπει να γίνει με κύτταρα στάσιμα. Εάν το πρώτο πείραμα είναι θετικό αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί σ ένα κατάλληλο ανεξάρτητο πείραμα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα που δίνει τον αριθμό των αποικιών που καταμετρήθηκαν, τον αριθμό των μεταλλαχθέντων στελεχών, την επιβίωση και τη συχνότητα των μεταλλαχθέντων στελεχών. Όλα τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιωνονται με ένα ανεξάρτητο πείραμα. Τα δεδομένα πρέπει να εκτιμούνται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε,

— συνθήκες δοκιμασίας: κύτταρα σε στάσιμη φάση ή σε βλάστηση, σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, θερμοκρασία και διάρκεια επώασης, συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης,

— συνθήκες αγωγής: επίπεδα έκθεσης, διαδικασία και διάρκεια αγωγής, θερμοκρασία αγωγής, θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι,

— αριθμός των αποικιών που καταμετρήθηκαν, αριθμός μεταλλαχθέντων στελεχών, επιβίωση και συχνότητα μεταλλαχθέντων στελεχών, σχέση δόσης/αποτελέσματος, αν μπορεί να εφαρμοστεί, στατιστική εκτίμηση των δεδομένων,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

B.16. **ΜΙΤΩΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β,

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Ο μιτωτικός ανασυνδυασμάς στον Saccharomyces cerevisiae μπορεί να ανιχνευθεί ανάμεσα στα γονίδια (ή συνηθέστερα ανάμεσα σε ένα γονίδιο κατ το κεντρομερίδιό του) καθώς Επίσης και μέσα στα γονίδια. Το πρώτο φαινόμενο καλείται μιτωτικός επιχιασμός και παράγει αντίστοιχα προϊόντα, ενώ το τελευταίο είναι συχνότερα μη αντίστοιχο και καλείται μεταστροφή γονιδίων. Ο επιχιασμός δοκιμάζεται συνήθως με την παραγωγή υπολειπομένων ομοζυγων αποικιών ή τομέων που παράγονται σε ένα ετερόζυγο στέλεχος, ενώ η μεταστροφή γονιδίων δοκιμάζεται με την παραγωγή πρωτοτροφικών αναστροφέων που παράγονται σε ένα αυζατροπικό ετεροαλληλο-μορφικό στέλεχος που φέρει δύο διαφορετικά ελαττωματικά αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου. Τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα στελέχη για την ανίχνευση της μιτωτικής μεταστροφής γονιδίων είναιτα D_4 (ετεροαλληλόμορφα σε ade 2 και trp 5), το D_7 (ετεροαλληλόμορφα σε trp 5) και το JD 1 (ετεροαλληλόμορφα σε his 4 και trp 5) και το $BZ_{3\ 4}$ (ετεροαλληλόμορφα, σε arg 4). Ο μιτωτικός επιχιασμός που παράγει ερυθρούς και ροδόχρους ομόζυγους τομείς μπορεί να δοκιμαστεί στο D_1 ή στο D_7 (το οποίο επίσης μετρά την μιτωτική μετατροπή γονιδίων και την αντίστροφη μετάλλαξη σε ilv 1-92), Και τα δύο στελέχη στην περίπτωση αυτή είναι ετεροαλληλόμορφα ως προς συμπληρωματικά αλληλόμορφα του ade 2.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

Τα διαλύματα των δοκιμαζόμενων χημικών ουσιών και των μαρτύρων ή ουσιών ελέγχου και αναφοράς πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν από τη δοκιμασία, με τη χρήση κατάλληλου φορέα. Για υδρόφοβες οργανικές ενώσεις πρέπει να χρησιμοποιείται διάλυμα μέχρι 2 % κατ' όγκο σε οργανικούς διαλύτες, όπως η αιθανόλη, η ακετόνη και το δίμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα εκτίθενται στις δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες, τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης.

Το περισσότερο χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα συνεργό μεταμιτοχονδριακό κλάσμα από το ήπαρ τρωκτικών που έχουν υποστεί προηγούμενη αγωγή με παράγοντες που επάγουν ένζυμα, Η χρήση άλλων ειδών οργανισμών, ιστών, μεταμιτοχονδριακών κλασμάτων ή διαδικασιών μπορεί επίσης να είναι κατάλληλη για μεταβολική ενεργοποίηση.

▼B

Συνθήκες δοκιμασίας

Στελέχη δοκιμασιών

Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα στελέχη είναι τα διπλοειδή D_4, D_5, D_7 και JD 1. Η χρήση και άλλων στελεχών μπορεί να είναι κατάλληλη.

Μέσον καλλιέργειας

Προσφυές μέσον καλλιέργειας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επιβίωσης και της συχνότητας του μιτωτικού ανασυνδυασμού.

Χρήση αρνητικών και θετικών μαρτύρων

Πρέπει να εκτελούνται συγχρόνως με τη δοκιμασία θετικοί έλεγχοι, έλεγχοι χωρίς προηγούμενη αγωγή και έλεγχοι διαλυτών με μάρτυρες. Για κάθε τελικό σημείο ανασυνδυασμού πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες χημικές ουσίες σαν θετικοί μάρτυρες.

Συγκέντρωση έκθεσης

Πρέπει να χρησιμοποιηθούν πέντε τουλάχιστον κατάλληλα κατανεμημένες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Μεταξύ των παραγόντων που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι η κυτταροτοξικότητα και ή διαλυτότητα. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν πρέπει να έχουν καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Για τις τοξικές χημικές ουσίες, η υψηλότερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση δεν πρέπει να μειώνει την επιβίωση κάτω από 5 έως 10 %. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι τα όρια διαλυτότητας, με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για τις πολύ υδατοδιαλύτές μη τοξικές χημικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση του πειράματος πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

Τα κύτταρα μπορούν να εκτίθενται σε δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες είτε σε στάσιμη φάση είτε κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, για περιόδους μέχρι 18 ωρών. Ωστόσο, για μακρές περιόδους αγωγής, οι καλλιέργειες πρέπει να επιθεωρούνται μικροσκοπικά για τον σχηματισμό σπορίων, η παρουσία των οποίων αχρηστεύει το πείραμα.

Συνθήκες επώασης

Οι καλλιέργειες επωάζονται στο σκοτάδι επί τέσσερις έως επτά ημέρες, σε 28 έως 30 °C. Οι καλλιέργειες αυτές που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή των ερυθρών και ροδόχρων ομόζυγων τομέων που παράγονται από μιτωτικό επιχιασμό, πρέπει να διατηρούνται σε ψυγείο (4 °C) για μία έως δύο ημέρες πριν από την καταμέτρηση, έτσι ώστε να αναπτυχθούν οι κατάλληλες χρωματισμένες αποικίες.

Συχνότητες αυθόρμητου μιτωτικού ανασυνδυασμού

Πρέπει να χρησιμοποιούνται υποκαλλιέργειες με συχνότητες αυθόρμητου μιτωτικού ανασυνδυασμού μέσα σε αποδεκτά κανονικά πλαίσια.

▼B

Αριθμός επαναλήψεων

Ένα ελάχιστο όριο τριών επαναλήψεων μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο πρέπει να χρησιμοποιείται ανά συγκέντρωση για το πείραμα των πρωτοτροφικών που παράγονται από μιτωτική μεταστροφή γονιδίων καθώς και για τη βιωσιμότητα. Στην περίπτωση της δοκιμασίας των υπολειπόμενων ομοζυγωτών που παράγονται από μιτωτικό επιχιασμό, ο αριθμός καλλιεργειών μέσα σε αγάρ αγάρ σε τρυβλίο πρέπει να αυξηθεί ώστε να υπάρξει ικανός αριθμός αποικιών.

Διαδικασία

Η αγωγή των στελεχών του Saccharomyces cerevisiae εκτελείται συνήθως μέσα σε υγρά με στάσιμα ή αναπτυσσόμενα κύτταρα. Προκαταρκτικά πειράματα πρέπει να γίνονται με αναπτυσσόμενα κύτταρα. 1 - 5 × 10^7 κύτταρα/ml εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία μέχρι 18 ώρες, σε 28 ° έως 37 °C, με ανάδευση. Κατά τη διάρκεια της αγωγής προστίθεται επαρκής ποσότητα μικροσωμικού κλάσματος όταν επιβάλλεται. Κατά το τέλος της αγωγής, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται, πλένονται και εμφυτεύονται σε κατάλληλο υλικό καλλιέργειας. Μετά την επώαση, οι καλλιέργειες μέσα σε αγάρ αγάρ καταμετρούνται για προσδιορισμό επιβίωσης και επαγωγής μιτωτικού ανασυνδυασμού. Εάν το πρώτο πείραμα είναι αρνητικό, τότε ένα δεύτερο πείραμα δρέπει να γίνει με στάσιμα κύτταρα. Εάν το πρώτο πείραμα είναι θετικό, αυτό πρέπει να επιβεβαιώνεται σε κατάλληλο ανεξάρτητο πείραμα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακος, ο οποίος δίνει τον αριθμό των αποικιών που καταμετρήθηκαν, τον αριθμό των στελεχών ανασυνδυασμού, την επιβίωση και τη συχνότητα των στελεχών ανασυνδυασμού.

Όλα τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται αν είναι δυνατό με ανεξάρτητο πείραμα.

Η εκτίμηση των δεδομένων γίνεται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση του πειράματος πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε,

— συνθήκες δοκιμασίας; κύτταρα σε στάσιμη φάση ή σε φάση ανάπτυξης, σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, θερμοκρασία και διάρκεια επώασης, σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης,

— συνθήκες αγωγής; συγκέντρωση ουσίας έκθεσης, διαδικασία και διάρκεια αγωγής, θερμοκρασία αγωγής, θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι,

— Αριθμός των αποικιών που καταμετρήθηκαν, αριθμός των στελεχών ανασυνδυασμού, επιβίωση και συχνότητα ανασυνδυασμού, σχέση δράσης/αποτελέσματος, εάν μπορεί να εφαρμοστεί, στατιστική αξιολόγηση των δεδομένων,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

▼B

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

B.17. **ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 476, *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *in vitro* δοκιμή κυτταρικής γονιδιακής μετάλλαξης στα θηλαστικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων που προκαλούνται από χημικές ουσίες. Στις κατάλληλες κυτταρικές σειρές περιλαμβάνονται L5178Y λεμφωματικά κύτταρα ποντικού, οι CHO, CHO-AS52 και V79 σειρές κυττάρων κινέζικου κρικητού και TK6 ανθρώπινα λεμφοβλαστοειδή κύτταρα (1). Στις κυτταρικές αυτές σειρές τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα γενετικά τελικά σημεία μετρούν μετάλλαξη σε θυμιδινοκινάση (TK) και φωσφοριβοζυλοτρανσφεράση υποξανθίνης-γουα-νίνης (HPRT) καθώς και ένα διαγονίδιο φωσφοριβοζυλοτρανσφεράσης ξανθίνης-γουανίνης (XPRT). Οι δοκιμές μετάλλαξης TK, HPRT και XPRT ανιχνεύουν διάφορα φάσματα γενετικών συμβάντων. Το γεγονός ότι οι TK και XPRT βρίσκονται σε αυτοσώματα μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση γενετικών συμβάντων (π.χ. μεγάλες απαλείψεις) που δεν ανιχνεύονται στο γενετικό τόπο HPRT σε X-χρωμυσώματα (2) (3) (4) (5) (6).

Στην *in vitro* δοκιμή κυτταρικής γονιδιακής μετάλλαξης σε θηλαστικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες καθιερωμένων κυτταρικών σειρών ή κυτταρικών στελεχών. Τα χρησιμοποιούμενα κύτταρα επιλέγονται με βάση την ικανότητα ανάπτυξης τους σε καλλιέργεια και τη σταθερότητα της συχνότητας αυθόρμητης μετάλλαξης.

Στις δοκιμές που διεξάγονται *in vitro* απαιτείται εν γίνει η χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης. Το σύστημα αυτό μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μπορεί να μιμηθεί εξ ολοκλήρου τις *in vivo* συνθήκες των θηλαστικών. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε vu αποφεύγονται συνθήκες που μπορεί να οδηγήσουν στη λήψη αποτελεσμάτων τα οποία δεν αντιπροσωπεύουν εγγενή μεταλλαξιγένεση. Θετικά αποτελέσματα που δεν αντικατοπτρίζουν εγγενή μεταλλαξιγένεση μπορεί να προέρχονται από αλλαγές στο pH, την οσμωμοριακότητα ή υψηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας (7).

Η παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό πιθανών μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων στα θηλαστικά. Πολλές ενώσεις που εμφανίζονται θετικές στην παρούσα δοκιμή είναι καρκινογόνες για τα θηλαστικά. Εντούτοις, δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση μεταξύ αυτής της δοκιμής και του φαινομένου της καρκινογένεσης. Η συσχέτιση εξαρτάται από τη χημική τάξη και υπάρχουν αύξουσες ενδείξεις ότι υπάρχουν καρκινογόνα που δεν ανιχνεύονται από τη δοκιμή αυτή γιατί δρουν μέσω άλλων, μη γονοτοξικών μηχανισμών ή μηχανισμών που απουσιάζουν στα βακτηριακά κύτταρα (6).

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Εξελικτική μετάλλαξη: γονιδιακή μετάλλαξη από το γονικό τύπο προς το προϊόν μετάλλαξης που προκαλεί αλλοίωση ή απώλεια της ενζυματικής δραστικότητας της λειτουργίας της κωδικοποιημένης πρωτείνης.

Μεταλλαξιγόνα υποκατάστασης ζευγών βάσεων: ουσίες που προκαλούν υποκατάσταση ενός ή περισσοτέρων ζευγών βάσεων στο DNA.

Μεταλλαξιγόνα αλλαγής πλαισίου: Ουσίες που προκαλούν προσθήκη ή απάλειψη ενός ή πολλών ζευγών βάσεων στο μόριο DNA.

▼B

Χρόνος φαινοτυπικής έκφρασης: περίοδος κατά την οποία μη αλλοιωμένα γονιδιακά προϊόντα υφίστανται μείωση από νεωστί μεταλλαγμένα κύτταρα.

Συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης: ο αριθμός των παρατηρουμένων μεταλλαγμένων κυττάρων διά του αριθμού βιώσιμων κυττάρων.

Σχετική συνολική ανάπτυξη: αύξηση του αριθμού των κυττάρων με το χρόνο σε σύγκριση με ένα κυτταρικό πληθυσμό μάρτυρα. Υπολογίζεται ως το γινόμενο της ανάπτυξης εναιωρήματος σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα επί την αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Σχετική ανάπτυξη εναιωρήματος: αύξηση του αριθμού των κυττάρων κατά την περίοδο έκφρασης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Βιωσιμότητα: η αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης των κατεργασμένων κυττάρων στο χρόνο της επίστρωσης σε τρυβλίο υπό επιλεκτικές συνθήκες μετά την περίοδο έκφρασης.

Επιβίωση: η αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης των κατεργασμένων κυττάρων όταν επιστρώνονται σε τρυβλίο στο τέλος της περιόδου κατεργασίας. Η επιβίωση εκφράζεται συνήθως σε σχέση με την επιβίωση του κυτταρικού πληθυσμού μάρτυρα.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Τα κύτταρα που παρουσιάζουν έλλειψη θυμιδινοκινάσης (TK) λόγω της μετάλλαξης $TK^{+/-}$ —> $TK^{+/-}$ παρουσιάζουν αντίσταση στην κυτταροτοξική επίδραση του πυριμιδινικού αναλόγου τριψθοροθυμιδίνη (TFT). Τα κύτταρα με θυμιδινοκινάση είναι ευαίσθητα στην TFT, πράγμα το οποίο εμποδίζει τον κυτταρικό μεταβολισμό και σταματάει την περαιτέρω κυτταρική διαίρεση. Έτσι, τα μεταλλαγμένα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται παρουσία TFT, ενώ τα κανονικά κύτταρα, τα οποία περιέχουν θυμιδινοκινάση, δεν μπορούν. Ομοίως, κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν έλλειφη σε HPRT ή XPRT επιλέγονται επειδή παρουσιάζουν αντίσταση στην 6-θειογνουανίνη (TG) ή 8-αζαγουανίνη (AG). Εάν σε κάποια από τις δοκιμές κυτταρικής γονιδιακής μετάλλαξης σε θηλαστικά υποβάλλεται σε δοκιμή ανάλογη βάση ή ένωση σχετική με τον παράγοντα επιλογής, θα πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά οι ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας. Για παράδειγμα, θα πρέπει να διερευνάται οποιαδήποτε τυχόν υπόνοια επιλεκτικής τοξικότητας της υπό δοκιμή ουσίας έναντι των μεταλλαγμένων και μη κυττάρων. Κατά την υποβολή λοιπόν σε δοκιμή χημικών ουσιών που έχουν σχέση από πλευράς δομής με τον παράγοντα επιλογής, θα πρέπει να επιβεβαιώνεται η απόδοση του συστήματος επιλογής/παράγοντα (8).

Τα υπό μορφή εναιωρήματος ή μονοστρωματικής καλλιέργειας κύτταρα εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία, με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, για κατάλληλο χρονικό διάστημα και κατόπιν φέρονται σε υποκαλλιέργειες για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας και για να επιτραπεί η φαινοτυπική έκφραση πριν από την επιλογή των προϊόντων μετάλλαξης (9) (10) (11) (12) (13). Η κυτταροτοξικότητα προσδιορίζεται συνήθως μετρώντας τη σχετική αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης (επιβίωση) ή τη σχετική συνολική ανάπτυξη των καλλιεργειών μετά την περίοδο κατεργασίας. Οι κατεργαζόμενες καλλιέργειες διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο για ικανό χρονικό διάστημα που είναι χαρακτηριστικό για κάθε επιλεγόμενο γενετικό τόπο και κυτταρικό τύπο, ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί η άριστη δυνατή φαινοτυπική έκφραση των προκληθεισών μεταλλάξεων. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης προσδιορίζεται ανακαλλιεργώντας γνωστούς αριθμούς κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τον παράγοντα επιλογής για την ανίχνευση μεταλλαγμένων κυττάρων και σε θρεπτικό μέσο χωρίς παράγοντα επιλογής για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας κλωνοποίησης (βιωσιμότητα). Έπειτα από κατάλληλο χρόνο επωάσεως, μετρώνται οι αποικίες. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης εξάγεται από τον αριθμό των μεταλλαγμένων αποικιών στο μέσο επιλογής και τον αριθμό των αποικιών σε μη επιλεκτικό μέσο.

▼B

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. **Προετοιμασίες**

1.4.1.1. *Κύτταρα*

Υπάρχουν διάφοροι κυτταρικοί τύποι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή αυτή, στους οποίους περιλαμβάνονται υποκλώνοι των L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 ή TK6 κυττάρων. Οι κυτταρικοί τύποι που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή αυτή θα πρέπει να έχουν αποδεδειγμένη ευαισθησία σε χημικά μεταλλαξιγόνα, υψηλή αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης και σταθερή αυθόρμητη συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης. Τα κύτταρα θα πρέπει να ελέγχονται για τυχόν παρουσία μυκοπλάσματος και εφόσον είναι μολυσμένα να μη χρησιμοποιούνται.

Η δοκιμή θα πρέπει να σχεδιάζεται έτσι ώστε να έχει προκαθορισμένη ευαισθησία και ισχύ. Ο αριθμός των κυττάρων, οι καλλιέργειες και οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας 9α πρέπει να αντικατοπτρίζουν αυτές τις καθορισμένες παραμέτρους (14). Ο ελάχιστος αριθμός βιώσιμων κυττάρων που επιζούν της κατεργασίας και χρησιμοποιούνται σε κάθε στάδιο της δοκιμής θα πρέπει να βασίζεται στη συχνότητα αυθόρμητης μετάλλαξης. Ένας γενικός κανόνας είναι να χρησιμοποιείται αριθμός κυττάρων που να είναι τουλάχιστον δεκαπλάσιος του αντιστρόφου της συχνότητας αυθόρμητης μετάλλαξης. Συνιστάται πάντως να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10^6 κύτταρα. Θα πρέπει να υπάρχει ιστορικό κατάλληλων στοιχείων για το χρησιμοποιούμενο κυτταρικό σύστημα που να αποδεικνύει τη συνεπή αποδοτικότητα της δοκιμής.

1.4.1.2. *Θρεπτικά μέσα και συνθήκες καλλιέργειας*

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα μέσα καλλιέργειας και συνθήκες επωάσεως (δοχεία καλλιέργειας, θερμοκρασία, συγκέντρωση CO_2 και υγρασία). Τα θρεπτικά μέσα θα πρέπει να επιλέγονται ανάλογα με τα συστήμιτα επιλογής και τον κυτταρικό τύπο που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Παίζει σημαντικό ρόλο οι συνθήκες καλλιέργειας να επιλέγονται έτσι ώστε να διασφαλίζεται η άριστη ανάπτυξη των κυττάρων κατά τη διάρκεια της περιόδου εκφράσεως και η ικανότητα σχηματισμού αποικιών μεταλλαγμένων και μη κυττάρων.

1.4.1.3. *Προετοιμασία των καλλιεργειών*

Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται από έτοιμες καλλιέργειες, ανακαλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο και επωάζονται στους 37 °C Πριν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή αυτή, οι καλλιέργειες ενδέχεται να χρειάζεται να καθαριστούν από προϋπάρχοντα μεταλλαγμένα κύτταρα.

1.4.1.4. *Μεταβολική ενεργοποίηση*

Τα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία παρουσία και απουσία κατάλληλου συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (S9) που παρασκευάζεται από ήπαρ τρωκτικών που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες όπως Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) ή μείγμα φαινοβαρβιτόνης και β-ναφθοφλαβόνης (19) (20).

Το μεταμιτοχονδριακό κλάσμα χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 1-10 % v/v στο τελικό μέσο δοκιμής. Η επιλογή και κατάσταση ενός συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης μπορεί να εξαρτάται από την τάξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία συγκεντρώσεις μεταμιτοχονδριακού κλάσματος.

▼B

Με ορισμένες αλλαγές, στις οποίες περιλαμβάνεται και η παρασκευή επεξεργασμένων με μεθόδους γενετικής μηχανικής κυτταρικών σειρών που εκφράζουν ειδικά ενεργοποιητικά ένζυμα, ενδέχεται να μπορεί να γίνει και ενδογενής ενεργοποίηση. Η επιλογή των χρησιμοποιουμένων κυτταρικών σειρών πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικώς (π.χ. από τη σχέση του κυτοχρωμικού P4 50 ισοενζύμου στο μεταβολισμό της υπό δοκιμή ουσίας).

1.4.1.5. *Υπό δοκιμή ουσία/προετοιμασία*

Οι στερεές υπό δοκιμή ουσίες πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται εφόσον απαιτείται πριν από την κατεργασία των κυττάρων. Οι υγρές ουσίες μπορούν να προστίθενται απευθείας στα συστήματα δοκιμής ή/και να αραιώνονται πριν από την κατεργασία. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας στοιχεία επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1. *Διαλύτης/φορέας*

Δεν πρέπει να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδραση του διαλύτη/φορέα με την υπό δοκιμή ουσία ενώ θα πρέπει να είναι συμβατός με την επιβίωση των κυττάρων και τη δραστικότητα S9. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν ανήκει στους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση ενός υδατικού διαλύτη/φορέα. Όταν εξετάζονται ουσίες που δεν είναι σταθερές στο νερό, οι χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες θα πρέπει να είναι απαλλαγμένοι ύδατος. Το νερό μπορεί να αφαιρεθεί με την προσθήκη μοριακού κοσκινού.

1.4.2.2. *Συγκεντρώσεις εκθέσεως*

Μεταξύ των κριτηρίων που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν καθορίζεται η μέγιστη προς χρήση συγκέντρωση είναι η κυτταροτοξικότητα, η διαλυτότητα στο σύστημα δοκιμής και οι μεταβολές στο pH ή την οσμωμοριακότητα.

Η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να προσδιορίζεται με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση στο κύριο πείραμα χρησιμοποιώντας μία κατάλληλη ένδειξη της ακεραιότητας και ανάπτυξης των κυττάρων όπως η σχετική αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης (επιβίωση) ή η σχετική συνολική ανάπτυξη. Χρήσιμο μπορεί να είναι ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας και διαλυτότητας να γίνει σε ένα προκαταρκτικό πείραμα.

Για την ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τέσσερις τουλάχιστον συγκεντρώσεις. Εφόσον εμφανίζονται φαινόμενα κυτταροτοξικότητας, οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να καλύπτουν μία περιοχή από τη μέγιστη μέχρι μικρή ή και μηδενική τοξικότητα. Λυτό σημαίνει συνήθως ότι οι συγκεντρώσεις δεν θα πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από ένα συντελεστή μεταξύ 2 και 10. Εφόσον η μέγιστη συγκέντρωση βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα, θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό 10-20 % (όχι όμως λιγότερο από 10 %) σχετικής επιβίωσης (σχετικής αποτελεσματικότητας κλωνοποίησης) ή σχετικής συνολικής ανάπτυξης. Για σχετικώς μη κυτταροτοξικές ουσίες, η μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι 5 μl/ml, 5 mg/ml ή 0,01 M, όποια από τις τρεις είναι χαμηλότερη.

▼B

Σχετικά αδιάλυτες ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή μέχρι ή και πέραν που ορίου διαλυτότητάς τους υπό τις συνθήκες καλλιέργειας. Τα σχετικά με τη δυσδιαλυτότητα στοιχεία θα πρέπει να προσδιορίζονται στο τελικό μέσο κατεργασίας στο οποίο εκτίθενται τα κύτταρα. Μπορεί να είναι χρήσιμο να υπολογιστεί η διαλυτότητα στην αρχή και το πέρας της κατεργασίας καθώς η διαλυτότητα μπορεί να αλλάζει κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο σύστημα δοκιμής λόγω της παρουσίας κυττάρων, S9, ορού, κ.λπ. Η μέγιστη διαλυτότητα μπορεί να ανιχνευθεί με γυμνό οφθαλμό. Το ίζημα δεν πρέπει να παρεμβαίνει στα αποτελέσματα της εκτίμησης.

1.4.2.3. *Μάρτυρες*

Σε κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνονται και καλλιέργειες με θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες (διαλύτης ή φορέας), με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Όταν χρησιμοποιείται μεταβολική ενεργοποίηση, ως θετικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται ουσία που απαιτεί ενεργοποίηση για την παροχή μεταλλαξιγόνου απόκρισης.

Παραδείγματα ουσιών-θετικών μαρτύρων είναι:

Μεταβολική ενεργοποίηση	Γενετικός τόπος	Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Απουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	HPRT	Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας	62-50-0	200-536-7
		Λιθυλονιτροζουρία	759-73-9	212-072-2
	TK (μικρές και μεγάλες αποικίες)	Μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας	62-50-0	200-536-7
		Αιθυλο νιτροζουρία	759-73-9	212-072-2
Παρουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	HPRT	3-μεϋυλοχολανθρένιο	56-49-5	200-276-4
		N-NΙτροζωδιμεθυλαμίνη	62-75-9	200-549-8
		7,12-διμεθυλοβενζανθρακένιο	57-97-6	200-359-5
	TK (μικρές και μεγάλες αποικίες)	Κυκλοφωσφαμίοιο	50-18-0	200-015-4
		Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	6055-19-2	
		Βενζο[α]πυρένιο	50-32-8	200-028-5
		3-μεθυλοχολανϊ)ρένιο	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-νιτροζωδιμεθυλαμίνη (για υψηλά επίπεδα S9)	62-75-9	200-549-8
		Βενζο[α]πυρένιο	50-32-8	200-028-5

Ως θετικοί μάρτυρες αναφοράς μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες ουσίες, π.χ. εάν ένα εργαστήριο έχει ένα ιστορικό με στοιχεία για την 5-βρωμο-2'-δεοξυουριδίνη (αριθ. CAS 59-14-3, αριθ. EINECS αριθ. 200-415-9), μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αυτή η ουσία αναφοράς, Εφόσον υπάρχουν, θα πρέπει να εξετάζεται η χρήση ως θετικών μαρτύρων ουσιών σχετικής χημικής τάξης.

▼B

Θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, αποτελούμενοι από μόνο τον διαλύτη ή το φορέα στο μέσο κατεργασίας, και κατεργασμένοι με τον ίδιο τρόπο με εκείνο των καλλιεργειών της υπό δοκιμή ουσίας. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποστάντες επεξεργασίας μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν πρότερα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξιγόνα αποτελέσματα.

1.4.3. **Διαδικασία**

1.4.3.1. *Κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία*

Πολλαπλασιασθέντα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Η έκθεση θα πρέπει να διαρκεί για κατάλληλο χρονικό διάστημα (συνήθως 3-6 ώρες είναι αρκετό). Ο χρόνος έκθεσης μπορεί να αντιστοιχεί σε ένα ή περισσότερους κυτταρικούς κύκλους.

Για κάθε συγκέντρωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν απλές ή διπλές καλλιέργειες της υπό δοκιμή ουσίας. Όταν χρησιμοποιούνται απλές καλλιέργειες, ο αριθμός των συγκεντρώσεων θα πρέπει να αυξάνεται ώστε να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος αριθμός καλλιεργειών για ανάλυση (π.χ. τουλάχιστον οκτώ προς ανάλυση συγκεντρώσεις). Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για αρνητικοί μάρτυρες (διαλύτης), θα πρέπει να είναι εις διπλούν.

Οι αέριες ή πτητικές ουσίες θα πρέπει να εξετάζονται με κατάλληλες μεθόδους, όπως π.χ. σε σφραγισμένα δοχεία καλλιέργειας (21) (22).

1.4.3.2. *Μέτρηση επιβίωσης, βιωσιμότητας και συχνότητας προϊόντων μετάλλαξηζ*

Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, τα κύτταρα πλένονται και καλλιεργούνται για τον προσδιορισμό της επιβίωσης και για να μπορέσει να επιτευχθεί η έκφραση του φαινοτύπου των προϊόντων μετάλλαξης. Η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας με τον προσδιορισμό της σχετικής αποτελεσματικότητας κλωνοποίησης (επιβίωσης) ή της σχετικής συνολικής ανάπτυξης των καλλιεργειών γίνεται συνήθως μετά την περίοδο κατεργασίας.

Κάθε γενετικός τόπος έχει καθορισμένες χρονικές απαιτήσεις για να πραγματοποιηθεί η κατ' ουσία άριστη φαινοτυπική έκφραση προσφάτως παραχθέντων προϊόντων μετάλλαξης (οι HPRT και XPRT απαιτούν τουλάχιστον 6-8 ημέρες και η TK τουλάχιστον 2 ημέρες). Τα κύτταρα αυξάνονται σε θρεπτικό μέσο με και χωρίς παράγοντα ή παράγοντες επιλογής για τον προσδιορισμό του αριθμού των προϊόντων μετάλλαξης και της αποτελεσματικότητας κλωνοποίησης, αντίστοιχα. Η μέτρηση της βιωσιμότητας (που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης) ξεκινά στο τέλος του χρόνου έκφρασης με επίστρωση σε μη επιλεκτικό μέσο.

Εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι θετική στη δοκιμή L5178Y $TK^{+/-}$, θα πρέπει να πραγματοποιείται μέτρηση μεγέθους των αποικιών σε μία τουλάχιστον από τις καλλιέργειες της δοκιμής (με την υψηλότερη θετική συγκέντρωση) καθώς και στον αρνητικό και θετικό μάρτυρα. Εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι αρνητική στη δοκιμή L5178Y $TK^{+/-}$, θα πρέπει να πραγματοποιείται μέτρηση μεγέθους αποικιών στον αρνητικό και θετικό μάρτυρα. Σε δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιείται $TK6TK^{+/-}$, μπορεί επίσης να γίνει μέτρηση μεγέθους αποικιών.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στα λαμβανόμενα στοιχεία θα πρέπει να περιλαμβάνεται προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας και βιωσιμότητας, ο αριθμός των αποικιών και η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης και για τις υπό δοκιμή καλλιέργειες και για τους μάρτυρες. Σε περίπτωση θετικής αποκρίσεως στη δοκιμή L5178Y $TK^{+/-}$, οι αποικίες καταμετρούνται με βάση τα κριτήρια για τις μικρές και μεγάλες αποικίες για μία τουλάχιστον συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας (μέγιστη θετική συγκέντρωση) και στον αρνητικό και τον θετικό μάρτυρα. Η μοριακή και κυτταρογενετική φύση και των μικρών και των μεγάλων αποικιών προϊόντων μετάλλαξης έχει μελετηθεί λεπτομερώς (23) (24). Στην δοκιμή $TK^{+/-}$, οι αποικίες καταμετρούνται με βάση τα κριτήρια για τις αποικίες κανονικής ανάπτυξης (μεγάλες) και βραδείας ανάπτυξης (μικρές) (25). Τα μεταλλαγμένα κύτταρα που έχουν υποστεί τις πλέον εκτεταμένες γενετικές βλάβες έχουν παρατεταμένο χρόνο διπλασιασμού και έτσι σχηματίζουν μικρές αποικίες. Οι βλάβες αυτές μπορούν να κυμαίνονται από απώλεια ολόκληρου του γονιδίου μέχρι καρυοτυπικώς ορατές χρωμοσωμικές εκτροπές. Η εμφάνιση προϊόντων μετάλλαξης σε μικρές αποικίες συνδέεται με χημικές ουσίες που προκαλούν σοβαρές χρωμοσωμικές εκτροπές (26). Τα μεταλλαγμένα κύτταρα που έχουν πληγεί λιγότερο σοβαρά, αναπτύσσονται με ρυθμούς παρόμοιους με εκείνους των γονικών κυττάρων και σχηματίζουν μεγάλες αποικίες.

Θα πρέπει να δίνεται η επιβίωση (σχετική αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης) ή η σχετική συνολική ανάπτυξη. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης θα πρέπει να εκφράζεται ως ο αριθμός των μεταλλαγμένων κυττάρων προς τον αριθμό των επιβιωσάντων κυττάρων.

Θα πρέπει να δίνονται στοιχεία για κάθε μεμονωμένη καλλιέργεια. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να δίνονται με τη μορφή πίνακα.

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφών θετικών αποκρίσεων. Τυχόν διφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να αποσαφηνίζονται με δοκιμές τροποποιώντας κατά προτίμηση τις πειραματικές συνθήκες. Τα αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται κατά περίπτωση. Στις περιπτώσεις όπου δεν κρίνεται αναγκαία η επιβεβαίωση των αρνητικών αποτελεσμάτων. θα πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση. Στα επιβεβαιωτικά πειράματα, τόσο για τα διφορούμενα όσο και για τα αρνητικά αποτελέσματα, θα πρέπει να εξετάζεται η τροποποίηση των παραμέτρων της μελέτης ώστε να καλύπτουν όλη την έκταση των εκτιμούμενων συνθηκών. Στις παραμέτρους που μπορούν να τροποποιηθούν περι-λαμβάνεται το εύρος των συγκεντρώσεων και οι συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα ως θετικό εφαρμόζονται διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με την συγκέντρωση αύξηση ή η αναπαραγώγιμη αύξηση στη συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης. Πρώτα θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι. Σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα.

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξιγόνος στο σύστημα αυτό.

▼B

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν τη εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστικότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από την *in vitro* δοκιμή κυτταρικής γονιδιακής μετάλλαξης σε θηλαστικά δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία επάγει γονιδιακές μεταλλάξεις στα χρησιμοποιηθέντα καλλιεργηθέντα κύτταρα θηλαστικού. Η περίπτωση με τη μεγαλύτερη σημαντικότητα είναι εκείνη όπου υπάρχει θετική και αναπαραγώγιμη συνάρτηση απόκρισης με συγκέντρωση. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν επάγει γονιδιακές μεταλλάξεις στα χρησιμοποιηθέντα καλλιεργηθέντα κύτταρα θηλαστικού.

3. **ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα/διαλύτη,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέα εφόσον είναι γνωστές.

Κύτταρα:

— τύπος και πηγή των κυττάρων,

— αριθμός των κυτταρικών καλλιεργειών,

— αριθμός κυτταρικών διελεύσεων, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— μέθοδοι συντήρησης της κυτταρικής καλλιέργειας, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— απουσία μυκοπλάσματος.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολογία για την επιλογή των συγκεντρώσεων και του αριθμού των καλλιεργειών συμπεριλαμβανομένων, π.χ. στοιχείων κυτταροτοξικότητας και περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— σύσταση του μέσου καλλιέργειας, συγκέντρωση CO_2,

— συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας,

— όγκος του φορέα και της προστιθέμενης υπό δοκιμή ουσίας,

— θερμοκρασία επωάσεως,

— χρόνος επωάσεως,

— διάρκεια της κατεργασίας,

— πυκνότητα των κυττάρων κατά την κατεργασία,

— τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, συμπεριλαμβανομένων και κριτηρίων αποδοχής,

— θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες,

▼B

— διάρκεια της περιόδου έκφρασης (συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των ανακαλλιεργηθέντων κυττάρων και των υποκαλλιεργειών και διαγραμμάτων διατροφής, εφόσον συντρέχει περίπτωση),

— παράγοντες επιλογής,

— κριτήρια για την κατάταξης μιας δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης.

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του αριθμού των βιώσιμων και των μεταλλαγμένων κυττάρων,

— ορισμός των αποικιών σχετικά με το μέγεθος και τον τύπο τους (συμπεριλαμβανομένων των κριτηρίων κατάταξης σε «μικρές» και «μεγάλες» αποικίες, εφόσον συντρέχει περίπτωση).

Αποτελέσματα:

— σημάδια τοξικότητας,

— σημάδια καθίζησης,

— στοιχεία για το pH και την οσμωμοριακότητα κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην υπό δοκιμή ουσία, εφόσον προσδιορίστηκαν,

— μέγεθος των αποικιών, εφόσον καταγράφηκε, τουλάχιστον για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες.

— επάρκεια του εργαστηρίου στην ανίχνευση μικροαποικιακών προϊόντων μετάλλαξης με το σύστημα L5178Y $TK^{+/-}$, όπου συντρέχει περίπτωση,

— σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,

— στατιστικές αναλύσεις, εφόσον υπάρχουν,

— παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες,

— προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης.

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Moore, M.M., DeMarini, D. M, DeSerres, K). and Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis,* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E. H. Y. and Mailing, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 61, pp. 1306-1312.

(3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.. 94,* pp. 467-485.

(4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis, 4,* pp. 394-403.

▼B

(5) Aaron, C. S. and Stankovvski. Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res.. 223. pp. 121-128

(6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankovvski, Jr. L. F, Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, pp. 235-239.

(7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 257, pp. 147-204.

(8) Clive, D., McCuen. R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res.. 115, pp. 225-251.

(9) Li, A. P.. Gupta, R. S., Heflich. R. H. and Wasson. J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxaiithine Guanine Phosphonbosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res.. 196. pp. 17-36.

(10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C, Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Cuanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res., 189,* pp. 135-141.

(11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human l.ymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, Mutation Res., 216, pp. 9-17.

(12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-lnduced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-lnduced Mutation in AS52 Cells, Mutation Res,. 160, pp. 133-147.

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Give, D. (1984), Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ — $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.

(14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. 1.., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: Statistical *Evaluation of Mutagenicity Test Data,* Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation *Res., 46,* pp. 365-373.

(16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

▼B

(17) Clive, D., Johnson, K. 0., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat Res.,* 59, pp. 61-108.

(18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (198 3), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation* Res., 113, pp. 173-215.

(19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcomc. C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-lnduced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis, 7,* pp. 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in *In Vitro* Metabolic *Activation in Mutagenesis Testing,* de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot. R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(21) Krahn, *D.* F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents,* New York, Plenum, pp. 91-103.

(22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental* Mutagenesis, 5, pp. 795-801.

(23) Applegate, M. L, Moore, M. M.. Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, pp. 51-55.

(24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C. Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidinc-Resistant (TFT^{1}) and Mutants of L51 78Y/-TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res, 151, pp. 161-174.

(25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, Mutation Res.. *229,* pp. 89-102.

(26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficicnt Mutant Frequency in I.5178Y/TK$^{+/-}$ — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, Mutagenesis 5, pp. 609-614.

▼B

B.18 **ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ DNA — ΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ DNA — ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ — *IN VITRO***

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία απρογραμμάτιστης σύνθεσης DNA (UDS) μετρά την επανόρθωση της σύνθεσης του DNA μετά την εκτομή και αφαίρεση τμήματος του DNA που περιέχουν την περιοχή της βλάβης, η οποία προκαλείται από χημικούς και φυσικούς παράγοντες. Η δοκιμασία βασίζεται στην εισαγωγή τριτιωμένης θυμιδίνης (^{3}H-TdR) στο DNA κυττάρων θηλαστικών, τα οποία δεν βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η λήψη της ^{3}H-TdR μπορεί να προσδιοριστεί με αυτοραδιογραφία ή με μέτρηση υγρού σπινθηρισμού (LSC) σε DNA από κύτταρα που έχουν υποστεί αγωγή. Εφόσον δεν χρησιμοποιούνται αρχέτυπα ηπατοκύτταρα ποντικών, τα κύτταρα θηλαστικών μέσα στην καλλιέργεια υφίστανται αγωγή με την δοκιμαζόμενη ουσία με ή χωρίς εξωγενή μεταβολική ενεργοποίηση. Η UDS μπορεί επίσης να μετρηθεί σε συστήματα *in vivo*.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

Οι δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες και οι μάρτυρες ελέγχου ή οι ουσίες αναφοράς πρέπει να προστεθούν σε θρεπτικό μέσον ανάπτυξης ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλο φορέα και έπειτα να διαλυθούν σε θρεπτικό μέσον ανάπτυξης για να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία. Η τελική συγκέντρωση του φορέα δεν πρέπει να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Καλλιέργειες αρχέτυπων ηπατοκυττάρων ποντικών, ανθρώπινων λεμφοκυττάρων ή καθορισμένες σειρές κυττάρων (π.χ. ανθρώπινοι διπλοειδείς ινοβλάστες) μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία.

Τα κύτταρα πρέπει να εκτεθούν στην πειραματική ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

Συνθήκες δοκιμασίας

Αριθμός καλλιεργειών

Δύο τουλάχιστον καλλιέργειες κυττάρων για την αυτό ραδιογραφία και έξι καλλιέργειες κυττάρων με LSC προσδιορισμούς UDS (ή λιγότερες, εάν επιστημονικά κρίνεται σκόπιμο) είναι απαραίτητες για κάθε πείραμα.

▼B

Χρήση αρνητικών και θετικών ελέγχων με μάρτυρες

Πρέπει να γίνονται συγχρόνως με κάθε πείραμα θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι (χωρίς αγωγή ή/και φορέα) με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση.

Παραδείγματα θετικών ελέγχων με μάρτυρες για τη δοκιμασία ηπατοκυττάρων αρουραίου είναι το 7,12-DMBA (7,12-όιμεθυλοβενζανθρακένιο) ή το 2-AAF (2-ακετυλαμινοφλουορένιο), Στην περίπτωση καθορισμένων σειρών κυττάρων το 4-NQO (οξείδιο-N της 4-νιτροκινολίνης) είναι ένα παράδειγμα θετικού ελέγχου τόσο για αυτοραδιογραφικά πειράματα όσο και για πειράματα με LSC, που εκτελούνται χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Η N-νατροζοδιμεθυλαμίνη αποτελεί παράδειγμα ουσίας θετικού ελέγχου, όταν χρησιμοποιούνται συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης.

Συγκέντρωση έκθεσης

Πρέπει να χρησιμοποιούνται πολλές συγκεντρώσεις της πειραματικής ουσίας επαρκείς για τον προσδιορισμό της ανταπόκρισης. Η υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να προκαλεί μερικές κυτταροτοξικές επιδράσεις. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ενώσεις πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους. Για πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές χημικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση της πειραματικής χημικής ουσίας πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

Κύτταρα

Πρέπει να χρησιμοποιείται προσφυές μέσον ανάπτυξης, κατάλληλη συγκέντρωση σε CO_2 καθώς και κατάλληλη θερμοκρασία και υγρασία για τη συντήρηση των καλλιεργειών. Οι καθορισμένες σειρές κυττάρων πρέπει να ελέγχονται περιοδικά για πρόσμειξη μυκοπλάσματος.

Επίσης είναι επιθυμητός ο περιοδικός έλεγχος των κυττάρων για σταθερότητα καρυοτύπου.

Μεταβολική ενεργοποίηση

Δεν χρησιμοποιείται σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης σε καλλιέργειες αρχετύπων ηπατοκυττάρων. Οι καθορισμένες σειρές κυττάρων και τα λεμφοκύτταρα εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

Διαδικασία

Παρασκευή καλλιεργειών

Οι καθορισμένες σειρές κυττάρων παράγονται από μόνιμες καλλιέργειες (π.χ. με θρυψινοποίηση ή με αποτίναξη), εμφυτεύονται σε δοχεία καλλιέργειας με κατάλληλη πυκνότητα και επωάζονται σε 37 °C.

Δημιουργούνται βραχυπρόθεσμες καλλιέργειες ηπατοκυττάρων αρουραίων, επιτρέποντας στα πρόσφατα αποσυνδεμένα ηπατοκύτταρα σε προσφυές μέσον να προσκολληθούν στην αναπτυσσόμενη επιφάνεια.

Οι καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων γίνονται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων τεχνικών μεθόδων.

▼B

Κατεργασία των καλλιεργειών με τη δοκιμαζόμενη ουσία

Αρχέτυπα ηπατοκύτταρα αρουραίου: Πρόσφατα απομονωμένα ηπατοκύτταρα αρουραίου υφίστανται κατεργασία με την δοκιμαζόμενη ουσία σε μέσον που περιέχει ^{3}H-TdR, για κατάλληλη χρονική περίοδο. Στο τέλος της περιόδου αγωγής τα κύτταρα πρέπει να αποσυρθούν από το μέσον, να εκπλυθούν, να μονιμοποιηθούν, και να στεγνώσουν.

Οι αντικειμενοφόροι πρέπει να εμβαπτισθούν σε αυτοραδιογραφικό γαλάκτωμα, να μείνουν σε 4 °C για κατάλληλο χρονικό διάστημα, να εμφανιστούν, να χρωσθούν και να γίνουν οι μετρήσεις.

Καθορισμένες σειρές κυττάρων και λεμφοκύτταρα

Τεχνικές αυτοραδιογραφίας: Οι καλλιέργειες κυττάρων εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία για κατάλληλο χρονικό διάστημα και έπειτα υφίστανται αγωγή με ^{3}H-TdR. Ο χρόνος καθορίζεται από τη φύση της ουσίας, τη δραστικότητα του συστήματος μεταβολισμού και τον τύπο των κυττάρων. Για την ανίχνευση της μέγιστης UDS, πρέπει να προστεθεί ^{3}H-TdR είτε ταυτόχρονα με την δοκιμαζόμενη ουσία είτε λίγα λεπτά μετά την έκθεση στην δοκιμαζόμενη ουσία.

Η επιλογή μεταξύ των δύο αυτών διαδικασιών επηρεάζεται από πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της δοκιμαζόμενης ουσίας και του ^{3}H-TdR.

Για να γίνει η διάκριση μεταξύ της UDS και του ημισυντηρητικού αναδιπλασιασμού του DNA, ο τελευταίος μπορεί να ανασταλεί, π.χ., με τη χρήση υλικού από το οποίο λείπει η αργινίνη, με χαμηλή περιεκτικότητα ορού ή με παρουσία υδροξυουρίας στο υλικό της καλλιέργειας.

Μετρήσεις της UDS με LSC: Πριν από την αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία, η είσοδος των κυττάρων στη φάση S πρέπει να εμποδιστεί, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Τα κύτταρα πρέπει να εκτεθούν στην πειραματική χημική ουσία όπως περιγράφεται για την αυτοραδιογραφία. Στο τέλος της περιόδου επώασης, το DNA πρέπει να αποσπαστεί από τα κύτταρα και να καθορισθεί το συνολικό περιεχόμενο DNA και η έκταση της ενσωμάτωσης του ^{3}H-TdR.

Πρέπει να σημειωθεί ότι όπου, στις παραπάνω τεχνικές, χρησιμοποιούνται ανθρώπινα λεμφοκύτταρα η αναστολή του ημισυντηρητικού αναδιπλασιασμού του DNA δεν είναι αναγκαία σε μη διεγερμένες καλλιέργειες.

Ανάλυση

Αυτοραδιογραφικοί προσδιορισμοί

Για τον προσδιορισμό της UDS σε κύτταρα που βρίσκονται μέσα σε καλλιέργεια, οι πυρήνες της φάσης S, δεν καταμετρώνται. 50 τουλάχιστον κύτταρα ανά συγκέντρωση πρέπει να μετρηθούν. Οι πλάκες πρέπει να κωδικοποιηθούν πριν καταμετρηθούν. Σε κάθε πλάκα πρέπει να καταμετρηθούν διάφορα ευρέως διαχωρισμένα τυχαία πεδία. Η ποσότητα της ενσωμάτωσης ^{3}H-TdR στο κυτταρόπλασμα πρέπει να προσδιοριστεί με την καταμέτρηση τριών περιοχών μεγέθους πυρήνα μέσα στο κυτταρόπλασμα κάθε καταμετρηθέντος κυττάρου.

Προσδιορισμοί με LSC

Πρέπει να χρησιμοποιηθεί επαρκής αριθμός καλλιεργειών για κάθε συγκέντρωση και για κάθε μάρτυρα για τον προσδιορισμό της UDS με LSC.

▼B

Όλα τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με ανεξάρτητο πείραμα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή πίνακα.

2.1. ΑΥΤΟΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η έκταση της ενσωμάτωσης του ^{3}H-TdR στο κυτταρόπλασμα και ο αριθμός των κόκκων που βρέθηκαν πάνω στον πυρήνα του κυττάρου πρέπει να καταγραφούν χωριστά. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέσες και επικρατούσες (mode) τιμές για την περιγραφή της κατανομής της έκτασης της ενσωμάτωσης του ^{3}H-TdR στο κυτταρόπλασμα και του αριθμού των κόκκων ανά πυρήνα.

2.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕ LSC

Στους προσδιορισμούς με LSC, η ενσωμάτωση της ^{3}H-TdR θα πρέπει να αναφέρεται σαν dpm/μg DNA.

Η μέση τιμή dpm/μg DNA με την μέση σταθερή απόκλιση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να περιγραφεί η κατανομή της ενσωμάτωσης.

Τα δεδομένα πρέπει να εκτιμώνται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, πυκνότητα και αριθμός διελεύσεων κατά το χρόνο αγωγής, αριθμός καλλιεργειών κυττάρων,

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη συντήρηση των καλλιεργειών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του θρεπτικού μέσου, της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης σε CO_2,

— δοκιμαζόμενη ουσία, φορέας, συγκεντρώσεις και αιτιολόγηση για την επιλογή των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δοκιμασία,

— στοιχεία για τα συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης,

— πρόγραμμα αγωγής,

— θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι,

— αυτοραδιογραφική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε,

— διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρεμπόδιση της εισόδου των κυττάρων στη φάση S,

— διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την απόσπαση του DNA και για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου DNA σε μετρήσεις LSC,

— σχέση δόσης/αποτελέσματος, όπου είναι δυνατόν,

— στατιστική εκτίμηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

▼B

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

B.19 **ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΑΔΕΛΦΩΝ ΧΡΩΜΑΤΙΔΩΝ *IN VITRO***

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η μέθοδος ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων (SCE) αποτελεί μια γρήγορη δοκιμασία για την ανίχνευση των ανταλλαγών του DNA μεταξύ δύο αδελφών χρωματίδων ενός διπλοποιημένου χρωμοσώματος. Η μέθοδος αυτή αντιπροσωπεύει την ανταλλαγή προϊόντων αναδιπλασιασμού του DNA σε φαινομενικά ομόλογες θέσεις. Η διαδικασία ανταλλαγής αφορά προφανώς θραύση του DNA και επανένωση, παρόλο ότι λίγα είναι γνωστά για τη μοριακή βάση. Η ανίχνευση των SCE απαιτεί τη δυνατότητα διαφορετικής σήμανσης αδελφών χρωματίδων, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με ενσωμάτωση βρωμοδεσοξυουριδίνης (BrdU) μέσα σε χρωμοσωμικό DNA για ένα ή δύο κυτταρικούς κύκλους.

Τα κύτταρα θηλαστικών *in vitro* εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία, με ή χωρίς σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης θηλαστικού, εάν χρειάζεται, και καλλιεργούνται για δύο κύκλους αναδιπλασμού σε υλικό το οποίο περιέχει BrdU.

Μετά από αγωγή με αναστολέα ατράκτου (π.χ. κολχικίνη) ώστε να μαζευτούν κύτταρα σε μία μεταφασική φάση μίτωσης (μετάφαση C), τα κύτταρα συλλέγονται και γίνονται παρασκευάσματα χρωμοσωμάτων.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

— Στη δοκιμασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρχέτυπες καλλιέργειες (ανθρώπινα λεμφοκύτταρα), ή καθορισμένες σειρές κυττάρων [κ.χ. κύτταρα ωοθηκών κινέζικου κρικητού (Chinese hamster)]. Οι σειρές κυττάρων πρέπει να ελέγχονται για πρόσμειξη μυκοπλάσματος.

— Πρέπει να χρησιμοποιηθούν προσφυές μέσον καλλιέργειας και κατάλληλες συνθήκες επώασης (π.χ. θερμοκρασία, δοχεία καλλιέργειας, συγκέντρωση σε $C0_2$ και υγρασία).

— Οι δοκιμαζόμενες ουσίες μπορούν να προστεθούν σε μέσον καλλιέργειας ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλους φορείς πριν από την αγωγή των κυττάρων. Η τελική συγκέντρωση ενός φορέα στο σύστημα καλλιέργειας δεν πρέπει να επηρεάζει σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων ή το ρυθμό ανάπτυξης και οι επιδράσεις στη συχνότητα των SCE πρέπει να παρακολουθούνται με έλεγχο διαλύτου.

▼B

— Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία τόσο με όσο και χωρίς σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης θηλαστικού. Εναλλακτικά, όπου χρησιμοποιούνται κυτταρικοί τύποι με εγγενή μεταβολική δραστηριότητα, ο ρυθμός και η φύση της δραστηριότητας πρέπει να είναι κατάλληλα για τη χημική κατηγορία που δοκιμάζεται.

Συνθήκες δοκιμασίας

Αριθμός καλλιεργειών

Διπλές τουλάχιστον καλλιέργειες χρησιμοποιούνται για κάθε πειραματική μέτρηση.

Χρήση θετικών και αρνητικών ελέγχων με μάρτυρες

Πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα θετικοί έλεγχοι με τη χρήση τόσο μιας ουσίας άμεσης ενέργειας όσο και μιας ουσίας που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση. Πρέπει επίσης να γίνεται έλεγχος του φορέα.

Τα παρακάτω είναι παραδείγματα ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν θετικοί έλεγχοι:

— ουσία άμεσης ενέργειας:

  — αιθυλοσουλφονικό μεθύλιο

— ουσία έμμεσης ενέργειας:

  — κυκλοφωσφαμίδιο.

Όπου είναι δυνατόν μπορεί να γίνεται και πρόσθετος θετικός έλεγχος με ουσία της ίδιας χημικής κατηγορίας όπως η χημική ουσία της δοκιμασίας.

Συγκέντρωση έκθεσης

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον κατάλληλα κατανεμημένες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Η υψηλότερη συγκέντρωση μπορεί να προκαλεί σημαντικές τοξικές επιδράσεις, αλλά πρέπει παρ' όλα αυτά να επιτρέπει επαρκή κυτταρικό αναδιπλασιασμό. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

Διαδικασία

Παρασκευή καλλιεργειών

Καθορισμένες σειρές κυττάρων δημιουργούνται από βασικές καλλιέργειες (π.χ. με θρυψινοποίηση ή με αποτίναξη), εμφυτεύονται σε δοχεία καλλιέργειας με κατάλληλη πυκνότητα και επωάζονται σε 37 °C. Για μονοστρωματικές καλλιέργειες, ο αριθμός κυττάρων ανά δοχείο καλλιέργειας πρέπει να ρυθμίζεται έτσι ώστε οι καλλιέργειες να μην είναι συνενωμένες περισσότερο από 50 % κατά το χρόνο της συλλογής. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καλλιέργεια εναιωρήματος.

Οι καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων γίνονται από ηπαρινισμένο αίμα με τη χρήση κατάλληλων τεχνικών μεθόδων και επωάζονται σε 37 °C,

▼B

Αγωγή

Τα κύτταρα σε εκθετική φάση ανάπτυξης εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία για κατάλληλη χρονική περίοδο (στις περισσότερες μία έως δύο ώρες είναι αρκετές), αλλά ο χρόνος αγωγής μπορεί να επεκταθεί μέχρι δύο πλήρεις κυτταρικούς κύκλους, σε ορισμένες περιπτώσεις. Κύτταρα χωρίς επαρκή εγγενή μ εταβολική δραστηριότητα πρέπει να εκτίθενται στην δοκιμαζόμενη χημική ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Κατά το τέλος της περιόδου της έκθεσης, τα κύτταρα πλένονται για να απομακρυνθεί η δοκιμαζόμενη ουσία και καλλιεργούνται για δύο κύκλους αναδιπλασιασμού με παρουσία BrdU, Σαν εναλλακτική διαδικασία, τα κύτταρα μπορούν να εκτεθούν ταυτόχρονα στην δοκιμαζόμενη χημική ουσία και στο BrdU για ολόκληρο το χρόνο καλλιέργειας δύο κυτταρικών κύκλων.

Οι καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων υφίστανται αγωγή ενώ βρίσκονται σε ημισύγχρονη κατάσταση.

Τα κύτταρα αναλύονται κατά τη δεύτερη διαίρεσή τους μετά την αγωγή, εξασφαλίζοντας ότι οι πιο ευαίσθητες φάσεις του κυτταρικού κύκλου έχουν εκτεθεί στη δοκιμαζόμενη ουσία. Όλες οι καλλιέργειες στις οποίες προστίθεται το BrdU πρέπει να βρίσκονται σε σκότος ή σε ημίφως, που παράγεται με λάμπες πυράκτωσης, μέχρι το χρόνο συλλογής των κυττάρων, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η φωτόλυση του DNA που περ ιέχει BrdU.

Συλλογή των κυττάρων

Οι καλλιέργειες κυττάρων υφίστανται αγωγή με αναστολέα ατράκτου (π.χ. κολχικίνη) μία έως τέσσερις ώρες πριν από τη συλλογή. Κάθε καλλιέργεια συλλέγεται και υφίσταται επεξεργασία χωριστά για την παρασκευή χρωμοσωμάτων.

Ετοιμασία χρωμοσωμάτων και χρώση

Η ετοιμασία χρωμοσωμάτων γίνεται με πρότυπες κυτταρογενετικές τεχνικές. Η χρώση των πλακών για να φανούν οι SCE μπορεί να εκτελεστεί με διάφορες τεχνικές (π.χ. μέθοδος φθορισμού και Giemsa).

Ανάλυση

Ο αριθμός των αναλυόμενων κυττάρων πρέπει να βασίζεται στη συχνότητα αυτογενούς ελέγχου των SCE. Συνήθως, 25 τουλάχιστον καλά διεσπαρμένες μεταφάσεις ανά καλλιέργεια αναλύονται για τις SCE. Οι πλάκες κωδικοποιούνται πριν από την ανάλυση. Στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα αναλύονται μόνο μεταφάσεις που περιέχουν 46 κεντρομερίδια.

Σε καθορισμένες σειρές κυττάρων αναλύονται μόνο μεταφάσεις που περιέχουν κεντρομερίδυα ± 2 του κανονικού αριθμού. Πρέπει να αναφέρεται εάν η κεντρομερική μεταβολή της σήμανσης καταγράφεται σαν SCE. Τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με ανεξάρτητο πείραμα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφή πίνακα.

Ο αριθμός των SCE για κάθε μετάφαση και ο αριθμός των SCE ανά χρωμόσωμα για κάθε μετάφαση πρέπει να καταγράφονται χωριστά για όλες τις καλλιέργειες που υφίστανται την αγωγή και για της καλλιέργειες του μάρτυρα.

Τα δεδομένα πρέπει να εκτιμώνται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

▼B

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, μέθοδοι συντήρησης της καλλιέργειας κυττάρων,

— συνθήκες του πειράματος: σύνθεση των υλικών, συγκέντρωση σε CO_2, συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας, έκδοχο που χρησιμοποιήθηκε, θερμοκρασία επώασης, χρόνος αγωγής, αναστολέας ατράκτου που χρησιμοποιήθηκε, συγκέντρωση του και διάρκεια αγωγής με αυτόν, τύπος συστήματος ενεργοποίησης θηλαστικού που χρησιμοποιήθηκε, θετικές και αρνητικές δοκιμασίες (μάρτυρες),

— αριθμός καλλιεργειών κυττάρων ανά δοκιμασία,

— λεπτομέρειες της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των τριβλίων,

— αριθμός των μεταφάσεων που αναλύθηκαν (στοιχεία χωριστά για κάθε καλλιέργεια),

— μέσος αριθμός SCE ανά μετάφαση και ανά χρωμόσωμα,

— κριτήρια για την καταγραφή των SCE,

— αιτιολόγηση της επιλογής της δόσης,

— σχέση δόσης/αποτελέσματος, εάν είναι δυνατόν,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

B.20 **ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΟΥ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΟΣ ΣΕ DROSOPHILA MELANOGASTER**

1. **ΜΕΘΟΔΟΙ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΑΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία αυτή (SLRL) με τη χρήση της Drosophila melanogaster ανιχνεύει την εμφάνιση μεταλλάξεων σημείου καθώς και μικρών αφαιρέσεων στη σειρά γεννητικών κυττάρων του εντόμου. Η δοκιμασία αυτή αποτελεί δοκιμή πρόσω μετάλλαξης για την εξέταση μεταλλάξεων 800 περίπου θέσεων επί του χρωμοσώματος Χ, που αντιπροσωπεύει το 80 % περίπου όλων των Χ-χρωμοσωμικών θέσεων. Το χρωμόσωμα Χ αντιπροσωπεύει περίπου το ένα πέμπτο ολόκληρου ταυ απλοειδούς γονοτύπου.

Οι μεταλλάξεις στο Χ-χρωμάσωμα της Drosophila melanogaster εκφράζονται φαινοτυπικά σε αρσενικά που φέρουν το μεταλλαγμένο γονίδιο. Όταν η μετάλλαξη είναι θανατηφόρα στην ημίζυγη κατάσταση, η παρουσία της συμπεραίνεται από την απουσία μιας συνομοταξίας αρσενικών απογόνων από τις δύο που παράγονται κανονικά από μια ετεράζυγη θηλυκή. Η δοκιμασία SLRL επωφελείται των γεγονότων αυτών με τη χρήση ειδικά σημασμένων και Τακτοποιημένων χρωμοσωμάτων.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

Βασικές καλλιέργειες

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα αρσενικά μιας καλά καθορισμένης καλλιέργειας φυσικού τύπου και τα θηλυκά της βασικής καλλιέργειας Muller-5. Άλλες κατάλληλα σημασμένες θηλυκές βασικές καλλιέργειες με πολλαπλά ανεστραμένα Χ-χρωμοσώματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν.

Δοκιμαζόμενη ουσία

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες πρέπει να διαλύονται οτο νερό. Οι ουσίες που είναι αδιάλυτες στο νερό μπορούν να διαλυθούν ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλα έκδοχα (π.χ. μείγμα αιθανόλης και Tween-60 ή 80), έπειτα να αραιωθούν με νερό η διάλυμα χλωριούχου νατρίου πριν τη χορήγηση. Το διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO) πρέπει να αποφεύγεται σαν έκδοχο.

▼B

Αριθμός ζώων

Η δοκιμασία πρέπει να σχεδιαστεί με προκαθορισμένη ευαισθησία και ισχύ. Η παρατηρούμενη συχνότητα αυτόματης μετάλλαξης στον κατάλληλο μάρτυρα θα επηρεάσει σοβαρά τον αριθμό των χρωμοσωμάτων που πρέπει να αναλυθούν.

Οδός χορήγησης

Η έκθεση μπορεί να είναι από το στόμα, με ένεση ή με έκθεση σε αέρια ή ατμούς. Η χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας μπορεί να διενεργηθεί σε σακχαροδιάλυμα. Όπου είναι αναγκαίο, οι ουσίες μπορεί να διαλυθούν σε διάλυμα NaCl 0,7 % και να εισαχθούν με ένεση στο θώρακα ή στην κοιλιά.

Χρήση αρνητικών και θετικών δοκιμασιών με μάρτυρες

Θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται αρνητικές δοκιμασίες (με έκδοχα) καθώς και θετικές. Ωστόσο, εάν υπάρχουν ιστορικά εργαστηριακά δεδομένα ελέγχου, δεν χρειάζονται σύγχρονες δοκιμασίες με μάρτυρες.

Επίπεδο έκθεσης

Τρία επίπεδα έκθεσης θεωρούνται απαραίτητα. Για μια αρχική εκτίμηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα επίπεδο έκθεσης της δοκιμαζόμενης ουσίας, το οποίο μπορεί να είναι είτε η ανώτατη ανεκτή συγκέντρωση είτε εκείνη που παράγει κάποια ένδειξη τοξικότητας. Για τις μη τοξικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιηθεί η έκθεση στην ανώτατη δυνατή συγκέντρωση.

Διαδικασία

Τα αρσενικά φυσικού (wild) τύπου (ηλικίας τριών έως πέντε ημερών) υφίστανται αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία και ζευγαρώνονται χωριστά με πλεόνασμα παρθένων θηλυκών της βασικής καλλιέργειας Muller-5 ή από άλλη κατάλληλη σημασμένη βασική καλλιέργεια (με πολλαπλά ανεστραμμένα Χ-χρωμοσώματα). Τα θηλυκά αντικαθίστανται με καινούργια παρθένα θηλυκά κάθε δύο ως τρεις ημέρες για την κάλυψη ολοκλήρου του κύκλου του γεννητικού κυττάρου. Οι απόγονοι των θηλυκών αυτών καταγράφονται για θανατηφόρες επιδράσεις σε σχέση με τις επιδράσεις στο ώριμο σπέρμα, στα σπερματίδια μέσης ή τελευταίας φάσης, στα πρώιμα σπερματίδια, στα σπερματοκύτταρά και στα σπερματογόνια, κατά τη διάρκεια αγωγής.

Τα ετερόζυγα θηλυκά F_1 των παραπάνω διασταυρώσεων επιτρέπεται να ζευγαρώσουν χωριστά (π.χ. ένα θηλυκό ανά φιαλίδιο) με τους αδελφούς τους. Στη γενεά F_2 σε κάθε καλλιέργεια καταγράφεται η απουσία αρσενικών φυσικού (wild) τύπου, Εάν μια καλλιέργεια εμφανίζεται να έχει προκύψει από ένα θηλυκό F_1 που έχει ένα θανατογόνο γονίδιο στο μητρικό Χ-χρωμόσωμα (π.χ. δεν παρατηρούνται καθόλου αρσενικά με το υφιστάμενο αγωγή χρωμόσωμα), οι θυγατέρες του θηλυκΌύ αυτού με τον ίδιο *γονότυπο* θα πρέπει να εξετασθούν για να διαπιστωθεί εάν η θνησιμότητα επαναλαμβάνεται στην επόμενη γενεά.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφή πίνακα που να δείχνει τον αριθμό των Χ-χρωμοσωμάτων που εξετάσθηκαν, τον αριθμό των μη γόνιμων αρσενικών και τον αριθμό των θανατογόνων χρωμοσωμάτων σε κάθε συγκέντρωση έκθεσης και για κάθε περίοδο ζευγαρώματος, για κάθε αρσενικό που υπέστη αγωγή. Οι αριθμοί συσσωματωμάτων διαφορετικών μεγεθών ανά αρσενικό πρέπει να αναφέρονται. Τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με χωριστό πείραμα.

▼B

Για την αξιολόγηση των δοκιμασιών του τύπου αυτού πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι. Η συσσωμάτωση (clustering) των θανατογόνων γονιδίων που προέρχονται από ένα αρσενικό πρέπει να εξετάζεται και να αξιολογείται με κατάλληλο στατιστικό τρόπο.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— βασική καλλιέργεια: βασικές καλλιέργειες Drosophila ή στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, ηλικία των εντόμων, αριθμός των αρσενικών που δέχθηκαν αγωγή, αριθμός στείρων αρσενικών, αριθμός καθορισμένων καλλιεργειών F_1, αριθμός καλλιεργειών F_2 χωρίς απογόνους, αριθμός χρωμοσωμάτων που φέρουν θανατογόνο γονίδιο που διαπιστώθηκε σε κάθε φάση του γαμετογόνου κυττάρου,

— κριτήρια για τον καθορισμό του μεγέθους των ομάδων που υπέστησαν αγωγή,

— συνθήκες της δοκιμασίας: λεπτομερής περιγραφή του προγράμματος αγωγής και δειγματοληψίας, επίπεδα έκθεσης, δεδομένα τοξικότητας, αρνητικοί έλεγχοι (διαλύτες) με μάρτυρες και θετικοί έλεγχοι, εάν υπάρχουν,

— κριτήρια για την καταγραφή των θανατηφόρων μεταλλάξεων,

— σχέση έκθεσης/αποτελέσματος, όπου είναι δυνατόν,

— αξιολόγηση των δεδομένων,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

B.21 **ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ *IN VITRO***

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Συστήματα καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση φαινοτυπικών μεταβολών *in vitro* που προκαλούνται από χημικές ουσίες που σχετίζονται με κακοήθη μετασχηματισμό *in vivo*. Ευρύτερα χρησιμοποιούμενα κύτταρα είναι τα C3H10T 1/2, 3T3, SHE, αρουραίου Fisher και τα πειράματα βασίζονται στις μεταβολές της μορφολογίας των κυττάρων, στο σχηματισμό εστιών ή στις μεταβολές στην εξάρτηση στήριξης σε ημιστέρεη αγάρ αγάρ. Υπάρχουν και λιγότερο χρησιμοποιούμενα συστήματα, τα οποία ανιχνεύουν άλλες φυσιολογικές ή μορφολογικές μεταβολές στα κύτταρα μετά από έκθεση σε καρκινογόνες χημικές ουσίες. Κανένα από τα τελικά σημεία του πειράματος *in vitro* δεν έχει αποδεδειγμένη μηχανιστική σχέση με τον καρκίνο. Μερικά από τα πειραματικά συστήματα μπορούν να ανιχνεύουν προαγωγείς όγκων. Η κυτταροτοξικότητα μπορεί να καθοριστεί με τη μέτρηση της επίδρασης του υλικού της δοκιμασίας σε αποικία η οποία διαμορφώνει ικανότητες (κλωνική επάρκεια) ή ρυθμούς ανάπτυξης των καλλιεργειών. Η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας γίνεται για να αποδειχθεί ότι η έκθεση στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία ήταν τοξικολογικά σχετική αλλά ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συχνότητας μετασχηματισμού σε όλες τις δοκιμασίες λόγω του ότι μερικές μπορούν να αφορούν μακρόχρονη επώαση ή/και ανακαλλιέργεια σε τριβλίο.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

Κύτταρα

Υπάρχει μια ποικιλία σειρών κυττάρων ή αρχέτυπων κυττάρων, ανάλογα με την εκτελούμενη δοκιμασία μετασχηματισμού. Ο ερευνητής πρέπει να βεβαιωθεί ότι τα κύτταρα στην εκτελούμενη δοκιμασία παρουσιάζουν την κατάλληλη φαινοτυπική μεταβολή μετά από έκθεση σε γνωστά καρκινογόνα και ότι η δοκιμασία, στο εργαστήριό του, είναι αποδεδειγμένης και τεκμηριωμένης αξίας και αξιοπιστίας.

Μέσον καλλιέργειας

Πρέπει να χρησιμοποιούνται προσφυές μέσον και κατάλληλες πειραματικές συνθήκες για την εκτέλεση της δοκιμασίας μετασχηματισμού.

▼B

Δοκιμαζόμενη ουσία

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες μπορούν να προστεθούν σε υλικά καλλιέργειας ή να διαλυθούν ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλα έκδοχα πριν από την αγωγή των κυττάρων. Η τελική συγκέντρωση του εκδόχου στο σύστημα καλλιέργειας δεν πρέπει να επηρεάζει τη βιωσιμότητα του κυττάρου ή το ρυθμό ανάπτυξης ή τη συχνότητα εμφάνισης μετασχηματισμών.

Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Εναλλακτικά, όταν χρησιμοποιούνται κυτταρικοί τύποι, οι οποίοι διαθέτουν εγγενή μεταβολική δραστηριότητα, η φύση της δραστηριότητας πρέπει να είναι γνωστό ότι είναι κατάλληλη στη δοκιμαζόμενη χημική κατηγορία.

Συνθήκες δοκιμασίας

Χρήση θετικών και αρνητικών ελέγχων (μάρτυρες)

Σε κάθε πείραμα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και θετικοί έλεγχοι, με τη χρήση μιας ένωσης άμεσης ενέργειας και μιας ένωσης που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση. Πρέπει επίσης να χρησιμοποιείται ένας αρνητικός έλεγχος (με έκδοχο).

Τα παρακάτω είναι παραδείγματα ουσιών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν θετικοί μάρτυρες:

— χημικές ουσίες άμεσης ενέργειας:

  — αιθυλοσουλφονικό μεθύλιο,

  — β-προπιολακτόνη·

— ενώσεις που απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση;

  — 2-ακετυλαμινοφλουορένιο,

  — 4-διμεθυλαμινοβενζόλιο,

  — 7,12-διμεθυλοβενζανθρακένιο.

Όπου χρειάζεται, πρέπει να συμπεριλαμβάνεται ένας πρόσθετος θετικός έλεγχος με ουσία της ίδιας χημικής κατηγορίας όπου ανήκει η δοκιμαζόμενη ένωση.

Συγκεντρώσεις έκθεσης

Χρησιμοποιούνται διάφορες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Οι συγκεντρώσεις αυτές πρέπει να δημιουργούν μια τοξική επίδραση ανάλογη με τη συγκέντρωση, και η υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να παράγει χαμηλό επίπεδο επιβίωσης, ενώ η επιβίωση στη χαμηλότερη συγκέντρωση πρέπει να είναι κατά προσέγγιση η ίδια όπως και η επιβίωση στον αρνητικά μάρτυρα.

Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για εξαιρετικά υδατοδιαλυτές μη τοξικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση της ουσίας πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

▼B

Διαδικασία

Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται για κατάλληλη χρονική περίοδο, ανάλογα με το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιείται, το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει ανανέωση των δόσεων με αλλαγή και του μέσου (και αν είναι αναγκαίο, νέο μείγμα μεταβολικής ενεργοποίησης) στην περίπτωση παράτασης της έκθεσης. Τα κύτταρα που δεν διαθέτουν επαρκή εγγενή μεταβολική δραστηριότητα πρέπει να εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία με και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Κατά το τέλος της περιόδου έκθεσης τα κύτταρα πλένονται για να απομακρυνθεί η δοκιμαζόμενη ουσία και καλλιεργούνται υπό συνθήκες κατάλληλες για την εμφάνιση του παρακολουθούμενου μετασχηματισμένου φαινοτύπου και για τον καθορισμό της συχνότητας εμφάνισης μετασχηματισμών. Όλα τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται με ανεξάρτητο πείραμα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφή πίνακα και να μπορούν να παίρνουν μια ποικιλία μορφών ανάλογα με το εκτελούμενο πείραμα (π.χ. μέτρηση καλλιεργειών μέσα σε αγάρ αγάρ, θετικές καλλιέργειες ή αριθμός μετασχηματισμένων κυττάρων).Όπου χρειάζεται, η επιβίωση πρέπει να εκφράζεται σαν ποσοστό των επιπέδων ουσίας ελέγχου και η συχνότητα μετασχηματισμού να εκφράζεται σαν αριθμός των μετασχηματισμένων ανά αριθμό επιβιωσάντων.

Τα δεδομένα πρέπει να αξιολογούνται με τη χρήση κατάλληλης στατιστικής μεθόδου.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός καλλιεργειών κυττάρων, μέθοδοι συντήρησης της καλλιέργειας κυττάρων,

— συνθήκες διαδικασίας: συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας, έκδοχο που χρησιμοποιήθηκε, χρόνος επώασης, διάρκεια και συχνότητα αγωγής, πυκνότητα κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, τύπος χρησιμοποιούμενου συστήματος εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης, θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι, προδιαγραφές του παρακολουθούμενου φαινοτύπου, επιλεγμένο σύστημα που χρησιμοποιείται (εάν χρειάζεται), αιτιολόγηση της επιλογής δόσεων.

— method used to enumerate viable and transformed cells,

— statistical evaluation,

— discussion of results,

— interpretation of results.

3.2. EVALUATION AND INTERPRETATION

See General introduction Part B.

4. **REFERENCES**

See General introduction Part B.

▼B

B.22 **ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΟΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Οι επιδράσεις του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρας προκαλούν εμβρυϊκούς θανάτους. Η επαγωγή θανατηφόρων επικρατούντων χαρακτήρων με έκθεση σε χημική ουσία δείχνει ότι η ουσία επηρέασε τον σπερμικό ιστό των πειραματόζωων. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι θανατηφόροι επικρατούντες χαρακτήρες οφείλονται σε χρωμοσωμική βλάβη (δομικές και αριθμητικές ανωμαλίες).

Εάν η αγωγή παρέχεται στα θηλυκό, ο εμβρυϊκός θάνατος μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα τοξικών επιδράσεων. Γενικά, τα αρσενικά ζώα εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία και ζευγαρώνονται με παρθένα θηλυκά που δεν έχουν υποστεί αγωγή. Οι διάφορες φάσεις των γαμετογόνων κυττάρων μπορούν να ελεγχθούν με αλληλοδιάδοχα διαστήματα ζευγαρώματος. Η αύξηση των νεκρών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό στην ομάδα αγωγής σε σύγκριση με τα νεκρά εμφυτεύματα ανά θηλυκό στην ομάδα μάρτυρα αντανακλά την μετα-εμφυτευματική απώλεια. Η προ-εμφυτευματική απώλεια μπορεί να εκτιμηθεί με βάση τους αριθμούς των ωχρών σωματίων ή με σύγκριση των συνολικών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα που έχει υποστεί αγωγή και στην ομάδα ελέγχου. Η συνολική επίδραση του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος είναι το άθροισμα της προ- και μεταεμφυτευματικής απώλειας. Ο υπολογισμός της συνολικής επίδρασης του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος βασίζεται στη σύγκριση των ζωντανών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα δοκιμασίας προς τα ζωντανά εμφυτεύματα ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα μαρτύρων. Η μείωση του αριθμού των εμφυτευμάτων σε ορισμένα διαστήματα μπορεί να είναι αποτέλεσμα θανάτωσης κυττάρων (π.χ. σπερματοκυττάρων ή/και σπερματογονίων).

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες πρέπει όπου είναι δυνατό να διαλύονται ή να εναιωρούνται σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Χημικές ουσίες με υδατοδιαλυτές μπορούν να διαλυθούν ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλα έκδοχα. Το χρησιμοποιούμενο έκδοχο πρέπει να μην αντιδρά με την πειραματική χημική ουσία ούτε να παράγει τοξικές επιδράσεις. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της δοκιμαζόμενης χημικής ουσίας.

▼B

Συνθήκες δοκιμασίας

Οδός χορήγησης

Η δοκιμαζόμενη ουσία πρέπει γενικά να χορηγείται εφάπαξ. Με βάση τις τοξικολογικές πληροφορίες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρόγραμμα επαναλαμβανόμενης αγωγής. Οι συνηθισμένες οδοί χορήγησης είναι η εισαγωγή από το στόμα ή η ενδοπεριτονική ένεση. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες οδοί χορήγησης.

Πειραματόζωα

Οι αρουραίοι ή οι ποντικοί συνιστώνται σαν πειραματικό είδος. Γίνεται τυχαία επιλογή σε υγιή ζώα πλήρους σεξουαλικής ωριμότητας, τα οποία τοποθετούνται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μαρτύρων.

Αριθμός και φύλο

Πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκής αριθμός ζώων Αριθμός και φύλο Πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκής αριθμός ζώων για αγωγή, λαμβανομένης υπόψη της αυτογενούς μεταβολής του εκτιμώμενου βιολογικού χαρακτήρα. Ο αριθμός των επιλεγέντων ζώων πρέπει να βασίζεται στην προκαθορισμένη ευαισθησία ανίχνευσης και στο βαθμό σημαντικότητας. Για παράδειγμα, σε ένα τυπικό πείραμα, ο αριθμός των αρσενικών σε κάθε ομάδα δόσης πρέπει να είναι επαρκής για να δημιουργεί 30 έως 50 έγκυα θηλυκά ανά διάστημα ζευγαρώματος.

Χρήση αρνητικών και θετικών ελέγχων (μάρτυρες)

Σε κάθε πείραμα πρέπει συγχρόνως να γίνονται θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι (μάρτυρες). Όταν υπάρχουν αποδεκτά αποτελέσματα θετικών ελέγχων από πρόσφατα πειράματα στο ίδιο εργαστήριο, τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί ενός σύγχρονου θετικού ελέγχου. Οι ουσίες θετικού ελέγχου πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κατάλληλη χαμηλή δόση (π.χ. MMS, ενδοπεριτονιακά, σε 10 mg/kg) για την απόδειξη της ευαισθησίας της δοκιμασίας.

Επίπεδα δόσεων

Κανονικά πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία επίπεδα δόσεων. Η υψηλή δόση πρέπει να παράγει σημεία τοξικότητας ή μειωμένη γονιμότητα στα ζώα που υφίστανται την αγωγή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ένα μόνο επίπεδο υψηλής δόσης μπορεί να είναι επαρκές.

Οριακή δοκιμασία

Οι μη τοξικές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται σε 5 g/kg με εφάπαξ χορήγηση, ή σε 1 g/kg ανά ημέρα με επαναλαμβανόμενη χορήγηση.

Διαδικασία

Διατίθενται διάφορα προγράμματα αγωγής. Η εφάπαξ χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας χρησιμοποιείται ευρύτατα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα προγράμματα αγωγής.

Κάθε ένα από τα αρσενικά ζευγαρώνεται αλληλοδιάδοχα με ένα ή δύο παρθένα θηλυκά που δεν έχουν υποστεί αγωγή, σε κατάλληλα διαστήματα μετά την αγωγή. Τα θηλυκά πρέπει να αφεθούν με τα αρσενικά κατά τη διάρκεια ενός τουλάχιστον οιστρικού κύκλου ή μέχρι να επιτευχθεί το ζευγάρωμα που διαπιστώνεται από την παρουσία του σπέρματος στον κόλπο ή από την παρουσία βύσματος από πηγμένο σπέρμα στον κόλπο.

▼B

Ο αριθμός των ζευγαρωμάτων μετά την αγωγή διέπεται από το πρόγραμμα αγωγής και θα πρέπει να εξασφαλίζει τη λήψη δειγμάτων από όλες τις φάσεις του γαμετογόνου κυττάρου μετά την αγωγή.

Τα θηλυκά θανατώνονται κατά το δεύτερο ήμισυ της εγκυμοσύνης και το περιεχόμενο της μήτρας εξετάζεται για τον προσδιορισμό του αριθμού των νεκρών και ζωντανών εμφυτευμάτων. Οι ωοθήκες μπορούν να εξετασθούν για τον προσδιορισμό του αριθμού των ωχρών σωματίων.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφή πίνακα για να δείχνουν τον αριθμό των αρσενικών, τον αριθμό των εγκύων θηλυκών και τον αριθμό των μη εγκύων θηλυκών ζώων. Τα αποτελέσματα κάθε ζευγαρώματος, συμπεριλαμβανομένης της ταυτότητας κάθε αρσενικού και θηλυκού, πρέπει να εκτίθενται χωριστά.

Για κάθε θηλυκό πρέπει να αναφέρεται η εβδομάδα ζευγαρώματος και για τα αρσενικά το επίπεδο δόσης, και να καταγράφονται οι συχνότητες των ζωντανών εμφυτευμάτων.

Ο υπολογισμός της συνολικής επίδρασης του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος βασίζεται στη σύγκριση των ζωντανών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα δοκιμασίας προς τα ζωντανά εμφυτεύματα ανά θηλυκό στην ομάδα μάρτυρα. Η σχέση των νεκρών προς τα ζωντανά εμφυτεύματα από την ομάδα που υφίσταται αγωγή συγκρινόμενη προς την ίδια σχέση της ομάδας μάρτυρα αναλύεται για να προκύψει η μετεμφυτευματική απώλεια.

Εάν τα δεδομένα καταγράφονται σαν πρώιμοι και καθυστερημένοι θάνατοι, αυτό θα πρέπει να διευκρινιστεί στους πίνακες. Πρέπει να αναφερθεί, εάν έχει εκτιμηθεί, η προ-εμφυτευματική απώλεια. Η προ-εμφυτευματική απώλεια μπορεί να υπολογιστεί σαν διαφορά μεταξύ του αριθμού των ωχρών σωματίων και του αριθμού των εμφυτευμάτων ή σαν μείωση του μέσου αριθμού των εμφυτευμάτων ανά μήτρα σε σύγκριση με τα ζευγαρώματα μαρτύρων.

Τα δεδομένα αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— είδος, στέλεχος, ηλικία και βάρος των χρησιμοποιούμενων ζώων, αριθμός των ζώων ανά φύλο· οτην ομάδα δοκιμασίας και στην ομάδα ελέγχου,

— δοκιμαζόμενη ουσία, έκδοχο, δοκιμαζόμενο επίπεδο δόσης και αιτιολόγηση της επιλογής δόσεων, αρνητικοί και θετικοί έλεγχοι, δεδομένα τοξικότητας,

— οδός και διάρκεια έκθεσης,

— πρόγραμμα ζευγαρώματος,

— μέθοδος για την διαπίστωση του ζευγαρώματος,

— χρόνος θανάτωσης,

— κριτήρια για την καταγραφή του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος,

— σχέση δόσης/αποτελέσματος, εάν είναι δυνατόν,

▼B

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

B.23. ΔΟΚΙΜΗ ΣΠΕΡΜΟΓΟΝΙΑΚΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΕΚΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της *in vivo* δοκιμής σπερμογονιακής χρωμοσωμικής εκτροπής είναι ο εντοπισμός των ουσιών εκείνων που προκαλούν δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε σπερμογονιακά κύτταρα θηλαστικών (1) (2) (3) (4) (5). Οι δομικές εκτροπές μπορεί να είναι δύο τύπων, χρωμοσωμικές ή χρωματιδικές. Τα περισσότερα χημικά μεταλλαξιγόνα προκαλούν εκτροπές χωματιδικού τύπου, απαντώνται όμως και εκτροπές χρωμοσωμικού τύπου. Η παρούσα μέθοδος δεν έχει σχεδιαστεί για τη μέτρηση αριθμητικών εκτροπών και δεν χρησιμοποιείται συνήθως για το σκοπό αυτό. Οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και τα συναφή συμβάντα αποτελούν το αίτιο πολλών γενετικών ασθενειών στον άνθρωπο.

Με την παρούσα δοκιμή μετρούνται χρωμοσωμικά συμβάντα σε σπερμογονιακά γεννητικά κύτταρα και, συνεπώς, πιστεύεται ότι μπορεί με αυτήν να προβλεφθεί η επαγωγή κληρονομικών μεταλλάξεων στα γεννητικά κύτταρα.

Στη δοκιμή αυτή χρησιμοποιούνται συνήθως τρωκτικά. Λυτή η *in vivo* κυτταρογενετική δοκιμή ανιχνεύει χρωμοσωμικές εκτροπές σε σπερμογονιακές μιτώσεις. Άλλα κύτταρα στόχοι δεν αποτελούν αντικείμενο της μεθόδου αυτής.

Για την ανίχνευση εκτροπών χρωματιδικού τύπου σε σπερμογονιακά κύτταρα, θα πρέπει να εξετάζεται η πρώτη μιτωτική κυττορική διαίρεση μετά την κατεργασία πριν οι αλλοιώσεις αυτές απωλεσθούν στις επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις. Πρόσθετες πληροφορίες από τα υποβληθέντα σε κατεργασία σπερμογονιακά βλαστοκύτταρα μπορούν να ληφθούν από μειωτική χρωμοσωμική ανάλυση για χρωμοσωμικού τύπου εκτροπές στο στάδιο της διακίνησης-μετάφασης I όταν τα υπό κατεργασία κύτταρα γίνουν σπερματοκύτταρα.

Λυτή η *in vivo* δοκιμή έχει σχεδιαστεί για να διερευνάται αν μεταλλαξιγόνα σωματικών κυττάρων είναι δραστικά και σε γεννητικά κύτταρα. Επιπλέον, η σπερμογονιακή δοκιμή σχετίζεται με την εκτίμηση του κινδύνου μεταλλαξογένεσης δεδομένου ότι με αυτή μπορούν να εξεταστούν παράγοντες του *in vivo* μεταβολισμού, της φαρμακοκινητικής και των διεργασιών επιδιόρθωσης DNA.

Στους όρχεις υπάρχουν διάφορες γενεές σπερμογονίων με ένα ορισμένο φάσμα βαθμού ευαισθησίας στις χημικές ουσίες. Έτσι, οι εντοπιζόμενες εκτροπές αντιπροσωπεύουν τη συνολική απόκριση των υπό κατεργασία σπερμογονιακών κυτταρικών πληθυσμών, όπου δεσπόζουσα θέση καταλαμβάνουν τα πολυαριθμότερα διαφοροποιημένα σπερμογονιακά κύτταρα. Ανάλογα με τη θέση τους στους όρχεις, οι διάφορες γενεές σπερμογονίων μπορούν να εκτεθούν ή όχι στη γενική κυκλοφορία λόγω του φυσικού και φυσιολογικού φραγμού των Σερτολιείων κυττάρων και του φραγμού αίματος-όρχεων.

Εφόσον υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή ουσία, ή οι μεταβολίτες της. δεν πρόκειται να φθάσουν στον ιστό-στόχο, δεν είναι σκόπιμο να χρησιμοποιείται η δοκιμή αυτή.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Εκτροπή χρωματιδικού τόπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη μεμονωμένων χρωματιδών ή ρήξη και επανένωση μεταξύ χρωματιδών.

Εκτροπή χρωμοσωμικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη, ή ρήξη και επανένωση, και των δύο χρωματιδών στην ίδια θέση.

Χάσμα: αχρωματική βλάβη μικρότερη από το πλάτος μιας χρωματίδας και με ελάχιστη απευθυγράμμιση των χρωματιδών.

Αριθμητική εκτροπή: μεταβολή του αριθμού των χρωμοσωμάτων από τον κανονικό χαρακτηριστικό αριθμό των χρησιμοποιουμένων ζώων.

Πολυπλοειδία: πολλαπλάσιο του απλοειδούς χρωμοσωμικού αριθμού (η) πέραν του διπλοειδούς αριθμού (δηλαδή 3η, 4η κ.ο.κ.).

Δομική Εκτροπή: μεταβολή της δομής των χρωμοσωμάτων που ανιχνεύεται με παρατήρηση με μικροσκόπιο του σταδίου της μεταφάσεως της διαίρεσης των κυττάρων και γίνεται αντιληπτή με τη μορφή απαλείψεων, ενδοανταλλαγών ή ανταλλαγών.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Τα ζώα εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία από μία κατάλληλη οδό εκθέσεως και θυσιάζονται σε κατάλληλες χρονικές στιγμές μετά την αγωγή. Πριν από τη θυσία, τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή με ένα παράγοντα αναστολής μεταφάσεως (π.χ. κολχικίνη ή Colcemid®). Στη συνέχεια, παρασκευάζονται παρασκευάσματα από γεννητικά κύτταρα, χρωματίζονται και τα μεταφασικά κύτταρα εξετάζονται προς εντοπισμό τυχόν χρωμοσωμικών εκτροπών.

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. **Προετοιμασίες**

1.4.1.1. *Επιλογή ζωικών ειδών*

Συνήθως χρησιμοποιούνται αρσενικοί κινέζικοι κρικητοί και ποντικοί. Εντούτοις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και αρσενικά από άλλα κατάλληλα είδη θηλαστικών. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές φυλές νεαρών υγιών ενήλικων ζώων. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές στα βάρη των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 % του μέσου βάρους.

1.4.1.2. *Συνθήκες στέγασης και διατροφής*

Εφαρμόζονται οι γενικές συνθήκες που αναφέρονται στη γενική εισαγωγή του μέρους Β, αν και ο στόχος για την υγρασία θα πρέπει να είναι 50-60 %.

1.4.1.3. *Προετοιμασία των ζώων*

Υγιή νεαρά ενήλικα αρσενικά χωρίζονται τυχαία σε ομάδες μαρτυρίας και αγωγής. Τα κλουβιά θα πρέπει να διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν πιθανές επιδράσεις από τη θέση των κλουβιών. Τα ζώα λαμβάνουν μία αποκλειστική για το καθένα ταυτότητα. Τα ζώα εγκλιματίζονται στις εργαστηριακές συνθήκες για πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής.

▼B

1.4.1.4. *Προετοιμασία των δόσεων*

Στερεές υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν να χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να χορηγούνται απευθείας ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1. *Διαλύτης/φορέας*

Ο διαλύτης/φορέας δεν θα πρέπει να εμφανίζει τοξική δράση στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων αλλά ούτε και να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδραση του με την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν ανήκει στους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητα του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση ενός υδατικού διαλύτη/φορέα.

1.4.2.2. *Μάρτυρες*

Σε κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλα θετικοί και αρνητικοί (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες. Με εξαίρεση την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία, τα ζώα στις ομάδες μαρτυρίας θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με εκείνο των ζώων στις υποβαλλόμενες σε αγωγή ομάδες.

Οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να προκαλούν δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές *in vivo* σε σπερμογονιακά κύτταρα σε επίπεδα έκθεσης που αναμένεται να δώσουν ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο.

Οι δόσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε οι επιδράσεις να είναι σαφείς αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικεμενοφόρων στον παρατηρητή. Οι θετικοί μάρτυρες μπορούν να χορηγούνται και από οδό διαφορετική από εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας και να δειγματίζονται μόνο μία φορά. Εφόσον υπάρχουν, μπορεί να εξετάζεται η χρήση θετικών μαρτύρων παρόμοιας χημικής τάξης. Παραδείγματα ουσιών-θετικών μαρτύρων είναι:

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Κυκλοφωσφαμίδιο Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Κυκλοεξλαμίνη	108-91-8	203-629-0
Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6
Μονομφές ακρυλαμίδιο	79-06-1	201-173-7
Τριαιθυλενομελαμίνη	51-18-3	200-083-5

Για κάθε δειγματοληψία θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, υποβληθέντες σε αγωγή μόνο με διαλύτη ή φορέα αλλά με τον ίδιο κατά τα άλλα τρόπο με εκείνο των ομάδων της υπό δοκιμή ουσίας, εκτός κι αν από προϋπάρχοντα στοιχεία για τους μάρτυρες προκύπτουν αποδεκτές διαφοροποιήσεις και συχνότητες κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές μεταξύ των ζώων. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποβληθέντες σε αγωγή μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης/φορέας δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξιγόνα αποτελέσματα.

▼B

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. **Αριθμός ζώων**

Κάθε υποβαλλόμενη σε αγωγή ομάδα και ομάδα μάρτυρας πρέπει να αποτελείται από πέντε τουλάχιστον προς εξέταση αρσενικά.

1.5.2. **Χρονοδιάγραμμα αγωγής**

Οι υπό δοκιμή ουσίες χορηγούνται κατά προτίμηση μία ή δύο φορές (δηλαδή ως μία ή δύο αγωγές). Οι υπό δοκιμή ουσίες μπορούν επίσης να χορηγηθούν και διακεκομμένα, δηλαδή δύο αγωγές την ίδια ημέρα που να μην απέχουν χρονικά περισσότερο από μερικές ώρες, για να διευκολύνεται η χορήγηση μεγάλης ποσότητας ουσίας. Άλλοι τυχόν χρησιμοποιούμενοι τρόποι αγωγής θα πρέπει να αιτιολογούνται επιστημονικώς.

Στην ομάδα στην οποία δίνεται η μεγαλύτερη δόση, γίνονται δύο δειγματοληψίες μετά την αγωγή. Επειδή η κινητική του κυτταρικού κύκλου μπορεί να επηρεαστεί από την υπό δοκίμι] ουσία, πραγματοποιούνται μία πρώτη δειγματοληψία και μία δεύτερη δειγματοληψία αργότερα, 24 και 48 ώρες περίπου αντίστοιχα μετά την αγωγή. Για τις υπόλοιπες δόσεις, θα πρέπει να γίνεται μία δειγματοληψία στις 24 ώρες ή σε χρόνο που αντιστοιχεί στο 1,5 της χρονικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου μετά την αγωγή, εκτός κι αν είναι γνωστό ότι για την ανίχνευση των επιδράσεων είναι καταλληλότερος κάποιος άλλος χρόνος δειγματοληψίας {6}.

Επιπλέον, μπορούν να πραγματοποιηθούν δειγματοληψίες και σε άλλες χρονικές στιγμές. Για παράδειγμα, στην περίπτωση ουσιών που μπορεί να επαγάγουν χρωμοσωμική υστέρηση, ή μπορεί να ασκήσουν S-ανεξάρτητες επιδράσεις, μπορεί να είναι καλό να γίνει νωρίτερα η δειγματοληψία (1).

Το αν πρέπει να υπάρξει ή όχι χρονοδιάγραμμα επανειλημμένης αγωγής, αυτό χρειάζεται να εξετάζεται κατά περίπτωση. Στην περίπτωση επανειλημμένης αγωγής, τα ζώα θα πρέπει να θυσιάζονται 24 ώρες (1,5 κυτταρικό κύκλο) μετά την τελευταία αγωγή. Όπου χρειάζεται, μπορούν να υπαρξουν πρόσθετες δειγματοληψίες σε άλλους χρόνους.

Πριν από τη θυσία, στα ζώα εγχύεται ενδοπεριτοναικώς κατάλληλη δόση παράγοντα αναστολής μετάφασης (π.χ. Colcemid[1] ή κολχικίνη). Σε κατάλληλη χρονική στιγμή πραγματοποιείται δειγματοληψία στα ζώα. Για τους ποντικούς, η καταλληλότερη στιγμή είναι περίπου 3-5 ώρες, ενώ για τους κινέζικους κρικητούς το διάστημα αυτό αντιστοιχεί περίπου σε 4-5 ώρες.

1.5.3. **Επίπεδα δόσεων**

Εάν εκτελεστεί δοκιμή ανεύρεσης εύρους επειδή δεν υπάρχουν κατάλληλα διαθέσιμα δεδομένα, αυτή θα πρέπει να εκτελείται στο ίδιο εργαστήριο, με το ίδιο είδος, φυλή και τρόπο αγωγής που χρησιμοποιείται στην κύρια δοκιμή (7). Εφόσον υπάρχει τοξικότητα, στην πρώτη δειγματοληψία χρησιμοποιούνται τρία επίπεδα δόσεων. Τα επίπεδα αυτά δόσεων θα πρέπει να καλύπτουν μία περιοχή από τη μέγιστη μέχρι τη χαμηλή ή μηδενική τοξικότητα. Για τη δεύτερη δειγματοληψία, αρκεί να χρησιμοποιείται μόνο η μέγιστη δόση. Η μέγιστη δόση ορίζεται ως η δόση που παρέχει σημεία τοξικότητας τέτοια ώστε τυχόν υψηλότερα επίπεδα δόσης, με βάση τον ίδιο τρόπο χορήγησης, να αναμένεται φυσιολογικά να οδηγήσουν σε φαινόμενα θνησιμότητας.

▼B

Ουσίες με ειδικές βιολογικές δράσεις σε χαμηλές μη τοξικές δόσεις (όπως ορμόνες και μιτωγόνα) μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις στα κριτήρια ρύθμισης των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση. Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παρέχει ενδείξεις τοξικότητας στα σπερμογονιακά κύτταρα (π.χ. ελάττωση του λόγου των σπερμογονιακών μιτώσεων προς την πρώτη και δεύτερη μειωτική μετάφαση. Η ελάττωση αυτή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 50 %).

1.5.4. **Δοκιμή οριακής δόσης**

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα στην οποία χρησιμοποιείται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ίδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να θεωρηθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσης. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να δώσει μία ένδειξη της ανάγκης για χρησιμοποίηση υψηλότερου επίπεδου δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5. **Χορήγηση δόσεων**

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται συνήθως με διασωλήνωση χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα ή κατάλληλο σωλήνα διασωλήνωσης ή με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί έκθεσης εφόσον μπορούν να αιτιολογηθούν. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με διασωλήνωση ή έγχυση εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2 ml/100 g βάρους σώματος. Αν χρησιμοποιηθούν μεγαλύτεροι όγκοι, αυτό πρέπει να αιτιολογείται. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται προσαρμόζοντας τη συγκέντρωση ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

1.5.6. **Προετοιμασία των χρωμοσωμάτων**

Αμέσως μετά τη θυσία, λαμβάνονται από τον ένα ή και τους δύο όρχεις, εναιωρήματα κυττάρων που εκτίθενται σε υποτονικό διάλυμα και στερεώνονται. Τα κύτταρα κατόπιν επιστρώνονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και χρωματίζονται.

1.5.7. **Ανάλυση**

Για κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον 100 καλώς αναπτυγμένες μεταφάσεις (δηλαδή 500 κατ' ελάχιστο μεταφάσεις ανά ομάδα). Ο αριθμός αυτός μπορεί να μειωθεί όταν παρατηρείται υψηλός αριθμός εκτροπών. Όλες οι αντικειμενοφόροι, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, θα πρέπει να λαμβάνουν έναν ανεξάρτητο κωδικό πριν από την εξέταση στο μικροσκόπιο. Επειδή οι διαδικασίες στερέωσης απολήγουν συχνά στη ρήξη ενός ποσοστού μεταφάσεων με απώλεια χρωμοσωμάτων, τα καταμετρούμενα κύτταρα θα πρέπει να περιέχουν αριθμό κεντρομεριδίων ίσο με τον αριθμό 2n ± 2.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα στοιχεία για τα επιμέρους ζώα θα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα. Η πειραματική μονάδα είναι το ζώο. Για κάθε ζώο θα πρέπει να εκτιμάται ο αριθμός των κυττάρων με δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές και ο αριθμός των εκτροπών ανά κύτταρο. Οι διάφοροι τύποι δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών θα πρέπει να καταγράφονται με τον αριθμό και τη συχνότηαα τους στις υποβληθείσες σε αγωγή ομάδες και στις ομάδες μάρτυρες. Τα χάσματα καταγράφονται ξεχωριστά και περιλαμβάνονται στην έκθεση, γενικά όμως δεν περιλαμβάνονται στη συνολική συχνότητα εκτροπών.

▼B

Εφόσον παρατηρηθεί μίτωση καθώς επίσης και μείωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο λόγος των μιτώσεων σπερμογονίων προς την πρώτη και δεύτερη μειωτική μετάφαση ως μέτρο της κυτταροτοξικότητας για όλα τα υποβληθέντα σε αγωγή ζώα και τους αρνητικούς μάρτυρες σε συνολικό δείγμα 100 διαιρεμένων κυττάρων ανά ζώο για τον προσδιορισμό της δυνατής κυτταροτοξικής επίδρασης. Εφόσον παρατηρείται μόνο μίτωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο δείκτης μειώσεως σε 1 000 τουλάχιστον κύτταρα για κάθε ζώο.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα ως θετικό εφαρμόζονται διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με τη δόση αύξηση στο σχετικό αριθμό κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές ή η σαφής αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με εκτροπές σε μία μόνη δόση σε μία μόνη δειγματοληψία. Πρώτα θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι (8). Σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα. Τυχόν διφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να διασαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές τροποποιώντας, κατά προτίμηση, τις πειραματικές συνθήκες.

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξιγόνος στη δοκιμή αυτή.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν τη εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστικότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από την *in vivo* δοκιμή σπερμογονιακής χρωμοσωμικής εκτροπής δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία επάγει δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές στα γεννητικά κύτταρα των εξετασθέντων ειδών. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές στα γεννητικά κύτταρα των εξετασθέντων ειδών.

Θα πρέπει να εξετάζεται η πιθανότητα της υπό δοκιμή ουσίας ή των μεταβολιτών της να φθάνει στον ιστό στόχο.

3. **ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι γνωστές.

Εξετασθέντα ζώα:

— χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,

— αριθμός και ηλικία των ζώων,

— πηγή, συνθήκες στέγασης, δίαιτα, κ.λπ.,

— βάρος των μεμονωμένων ζώων στην έναρξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του εύρους των βαρών σώματος, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα.

▼B

Συνθήκες δοκιμής:

— στοιχεία από τη μελέτη του εύρους, εφόσον έγινε,

— αιτιολογία της επιλογής του επιπέδου δόσεως,

— αιτιολογία της χρησιμοποιηθείσας οδού χορήγησης.

— λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας,

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,

— αιτιολογία του χρονικού σημείου της θυσίας,

— μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη δίαιτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— λεπτομερής περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας,

— μέθοδοι για τις μετρήσεις της τοξικότητας,

— ταυτότητα της ουσίας αναστολής της μετάφασης, συγκέντρωση αυτής και διάρκεια της αγωγής,

— μέθοδοι ετοιμασίας αντικειμενοφόρων,

— κριτήρια για τη μέτρηση των εκτροπών,

— αριθμός εξετασθέντων κυττάρων ανά ζώο,

— κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης.

Αποτελέσματα:

— σημάδια τοξικότητας,

— μειωτικός δείκτης,

— λόγος σπερμογονιακών μιτώσεων προς πρώτη και δεύτερη μειωτικές μεταφάσεις,

— τύπος και αριθμός εκτροπών ξεχωριστά για κάθε ζώο,

— ολικός αριθμός εκτροπών ανά ομάδα,

— αριθμός κυττάρων με εκτροπές ανά ομάδα,

— σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,

— στατιστικές αναλύσεις, εφόσον υπάρχουν,

— παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς μάρτυρες,

— προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— παράλληλα στοιχεία για τους θετικούς μάρτυρες,

— αλλαγές στην πλοειδία, εφόσον παρατηρήθηκαν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

▼B

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: Genetic *Toxicology of Environmental* Chemicals, Part B: Genetic *Effects and* Applied Mutagenesis, Ramel. C, Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: *a Practical Approach, e*d. S. Venitt and J. M. Parry, 1RL Press, Oxford. Washington DC, pp. 275-306.

(3) Evans. E. P._1 Breckon, G. and Ford. C. L (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell* Genetics. 3. pp. 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A.. Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity* Tests, *UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on* Guidelines *for* Mutagenicity *Testing.* Report. Part i revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res., 52, pp. 207-209.

(6) Adler, 1. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, \V., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, Mutation Res., 312, pp. 313-318.

(7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D.). and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.

(8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage,). R. K. (1989), Statistical Analysis of in Vivo Cytogenetic Assays, in: D.). Kirkland (ed.), *Statistical* Evaluation *of Mutagenicity Test Data. UKEMS* Sub-Committee *on Guidelines for* Mutagenicity *Testing, report. Tart III,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.24 **ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΗΛΙΔΑΣ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Πρόκειται για μια δοκιμασία *in vivo* σε ποντικούς στους οποίους τα αναπτυσσόμενα έμβρυα εκτίθενται στις χημικές ουσίες. Τα κύτταρα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης στα αναπτυσσόμενα έμβρυα είναι οι μελανοβλάστες, τα δε γονίδια που αποτελούν στόχο του πειράματος είναι εκείνα που ελέγχουν τη χρώση του τριχώματος. Τα αναπτυσσόμενα έμβρυα είναι ετερόζυγα για ορισμένο αριθμό αυτών των γονιδίων χρώσης του τριχώματος. Μετάλλαξη ή απώλεια του επικρατούς αλληλόμορφου ενός τέτοιου γονιδίου σε μελανοβλάστη έχει σαν αποτέλεσμα, την έκφραση του υπολειπομένου φαινοτύπου στα κατιόντα κύτταρά του που συνίσταται από μια κηλίδα μεταβληθέντος χρώματος στο τρίχωμα του προκύπτοντος ποντικού. Ο αριθμός των απογόνων με τέτοιες κηλίδες και μεταλλάξεις καταγράφεται και η συχνότητά τους συγκρίνεται με εκείνη μεταξύ των απογόνων που προκύπτουν από έμβρυα τα οποία υπέστησαν αγωγή μόνο με το διαλύτη. Η δοκιμασία κηλίδας σε ποντικό ανιχνεύει υποτιθέμενες σωματικές μεταλλάξεις σε εμβρυικά κύτταρα.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

Όπου είναι δυνατόν, οι δοκιμαζόμενες ουσίες διαλύονται ή εναιωρούνται σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Οι χημικές ουσίες που είναι αδιάλυτες στο νερό διαλύονται ή εναιωρούνται σε κατάλληλα έκδοχα, Το χρησιμοποιούμενο έκδοχο δεν πρέπει ούτε να αντιδρά με την δοκιμαζόμενη χημική ουσία ούτε να παράγει τοξικές επιδράσεις. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της δοκιμαζόμενης χημικής ουσίας.

Π ε ι ρ α μ α τ ό ζ ω α

Οι ποντικοί του στελέχους T (nonagouti a/a chinchilla, pink eye, c^{ch} p/c^{ch} p; brown, b/b, dilute, short ear, d se/d se piebald spotting, s/s) ζευγαρώνονται είτε με ποικιλία στελέχους HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp-leaden fuzzy, ln fz/ln fz- pearl pe/pe) ή με C 57 BL (nonagouti, a/a). Αλλες κατάλληλες διασταυρώσεις όπως είναι μεταξύ NMRI (nonagouti, a/a' albino c/c) και DBA (nonagouti, a/a' brown b/b' dilute d/d) μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρκεί να παράγουν απογόνους nonagouti.

▼B

Αριθμός και φύλο

Επαρκής αριθμός εγκύων θηλυκών ζώων υφίστανται αγωγή για να υπάρξει κατάλληλος αριθμός επιζώντων απογόνων για κάθε χρησιμοποιούμενο επίπεδο δόσης. Το κατάλληλο μέγεθος δείγματος διέπεται από τον αριθμό των κηλίδων που παρατηρούνται στους ποντικούς που υφίστανται αγωγή και από την κλίμακα των δεδομένων του μάρτυρα. Αρνητικό αποτέλεσμα είναι αποδεκτό μόνο όταν καταγράφηκαν 300 τουλάχιστον απόγονοι από θηλυκά που υπέστησαν αγωγή με την υψηλότερη δόση.

Θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι με μάρτυρες

Συγχρόνως με τη δοκιμασία πρέπει να γίνονται έλεγχοι με ποντικούς που υπέστησαν αγωγή μόνο με το έκδοχο (αρνητικοί έλεγχοι), Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ιστορικά δεδομένα ελέγχου από το ίδιο εργαστήριο για την αύξηση της ευαισθησίας της δοκιμασίας, υπό τον όρο ότι τα δεδομένα θα είναι ομογενή. Εάν η δοκιμαζόμενη χημική ουσία δεν δείχνει καθόλου μεταλλαξιογενετικότητα, πρέπει να διατίθενται συγκρίσιμα δεδομένα θετικού ελέγχου, τα οποία έχουν ληφθεί πρόσφατα στο ίδιο εργαστήριο, από την αγωγή με μια χημική ουσία η οποία να είναι γνωστό ότι παρουσιάζει μεταλλαξιογενετικότητα στη δοκιμασία αυτή.

Οδός χορήγησης

Οι συνήθεις οδοί χορήγησης είναι ο καθετηριασμός από το στόμα και η ενδοπεριτονιακή ένεση των εγκύων θηλυκών. Η αγωγή με εισπνοή ή με άλλες οδούς χορήγησης χρησιμοποιείται, όταν είναι δυνατόν.

Επίπεδα δόσεων

Δύο τουλάχιστον επίπεδα δόσεων χρησιμοποιούνται, συμπεριλαμβανομένου ενός επιπέδου που δείχνει σημεία τοξικότητας ή μειωμένο αριθμό εμβρύων της ίδιας μητέρας. Για μη τοξικές χημικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιείται η έκθεση στην ανώτατη πρακτικά δυνατή δόση.

Διαδικασία

Μία μοναδική αγωγή εφαρμόζεται κανονικά την όγδοη, ένατη και δέκατη ημέρα της εγκυμοσύνης, λαμβανομένης υπόψη σαν ημέρας 1 της ημέρας κατά την οποία παρατηρείται για πρώτη φορά το πηγμένο σπέρμα μέσα στον κόλπο. Οι ημέρες αυτές αντιστοιχούν στις ημέρες 7,25, 8,25 και 9,25 μετά τη σύλληψη. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαδοχικές αγωγές μετά από αυτές τις ημέρες.

Ανάλυση

Οι απόγονοι κωδικοποιούνται και καταγράφονται για χρωματιστές κηλίδες μετά τρεις και τέσσερις εβδομάδες από τη γέννηση. Διακρίνονται τρεις κλάσεις κηλίδων:

α) λευκές κηλίδες εντός 5 mm από την ημικοιλιακή γραμμή που υποτίθεται ότι προκύπτουν από τη θανάτωση κυττάρων (WMVS)·

β) κίτρινες, που ομοιάζουν με φαιές (agouti-like), κηλίδες που σχετίζονται με τους μαστούς, το λαιμό, τις μασχαλιαίες και βουβωνικές χώρες και το μέτωπο, οι οποίες υποτίθεται ότι προκύπτουν από κακή διαφοροποίηση των κυττάρων (misdifferentiation) (MDS)·

γ) χρωματιστές και λευκές κηλίδες, τυχαία κατανεμημένες πάνω ατο τρίχωμα, που υποτίθεται ότι προκύπτουν από σωματικές μεταλλάξεις (RS).

▼B

Και οι τρεις κλάσεις καταγράφονται, αλλά μόνο η τελευταία (RS) έχει γενετική σημασία. Τα προβλήματα της διάκρισης μεταξύ των κηλίδων MDS και RS μπορούν να επιλυθούν με φθορίζουσα μικροσκοπική εξέταση δείγματος του τριχώματος. Οι μακροσκοπικά εμφανείς μορφολογικές ανωμαλίες των απογόνων πρέπει να σημειωθούν.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα παρίστανται σαν συνολικός αριθμός καταγραφέντων απογόνων, και σαν αριθμός ζώων που έχουν μια ή περισσότερες κηλίδες υποτιθέμενης σωματικής μετάλλαξης. Τα δεδομένα της αγωγής και του αρνητικού ελέγχου συγκρίνονται χρησιμοποιώντας στατιστικές μεθόδους.

3. **ΣΥΝΤΑΓΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες;

— ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διασταύρωση,

— αριθμός εγκύων θηλυκών στην ομάδα δοκιμασίας και στην ομάδα μάρτυρα,

— μέσος αριθμός νεογνών κατά μητέρα στις ομάδες δοκιμασίας και στις ομάδες μάρτυρες κατά τη γέννηση και κατά τον απογαλακτισμό,

— επίπεδα δόσεων της δοκιμαζόμενης χημικής ουσίας,

— διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε,

— ημέρα εγκυμοσύνης κατά την οποία διενεργήθηκε η χορήγηση,

— οδός χορήγησης,

— συνολικός αριθμός καταγραφέντων απογόνων και αριθμός με WMVS, MDS και RS στην ομάδα δοκιμασίας και στην ομάδα μάρτυρα,

— μακροσκοπικές μορφολογικές ανωμαλίες,

— σχέση δόσης/αποτελέσματος των RS, όπου είναι δυνατόν,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

B.25 **ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΙΜΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία κληρονομήσιμης μετατόπισης γονιδίων σε ποντικούς ανιχνεύει τις δομικές και αριθμητικές μεταβολές χρωμοσωμάτων σε γεννητικά κύτταρα θηλαστικών που ανακαλύπτονται στους απογόνους της πρώτης γενεάς. Οι τύποι των μεταβολών χρωμοσωμάτων είναι αντίστοιχες μετατοπίσεις και, στην περίπτωση που συμπεριλαμβάνονται θηλυκοί απόγονοι, απώλεια Χ-χρωμοσωμάτων. Οι φορείς των μετατοπίσεων και ΧΟ-θηλυκά δείχνουν μειωμένη γονιμότητα και συνηθίζεται να επιλέγονται οι απόγονοι F_1 για κυτταρογενετική ανάλυση. Πλήρης στειρότητα προκαλείται από ορισμένους τύπους μετατοπίσεων (τύπου Χ-αυτοσωματικό και c-t). Οι μετατοπίσεις παρατηρούνται κυτταρογενετικά στα μειωτικά κύτταρα στη διακίνηση-μετάφαση Ι των αρσενικών ατόμων, είτε στα αρσενικά της ομάδας F_i είτε στους υιούς των θηλυκών της ομάδας F_1, Τα θηλυκά ΧΟ διαπιστώνονται κυτταρογενετικά από την παρουσία 39 μόνο χρωμοσωμάτων στις μιτώσεις του μυελού οστών.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

Οι δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες διαλύονται σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Εάν είναι αδιάλυτες, τότε διαλύονται ή εναιωρούνται σε κατάλληλα έκδοχα. Χρησιμοποιούνται πρόσφατα διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη διευκόλυνση της λήψης, δεν πρέπει να αντιδρά με την δοκιμαζόμενη ουσία ή να προκαλεί τοξικές επιδράσεις.

Οδός χορήγησης

Σαν οδοί χορήγησης συνήθως χρησιμοποιούνται ο καθετηριασμός από το στόμα ή η ενδοπεριτονιακή ένεση. Και άλλες οδοί χορήγησης μπορεί να είναι κατάλληλες.

Πειραματόζωα

Για τη διευκόλυνση της αναπαραγωγής και της κυτταρολογικής επαλήθευσης, τα πειράματα αυτά εκτελούνται με ποντικούς. Δεν απαιτείται ιδιαίτερο στέλεχος ποντικών. Ωστόσο ο μέσος αριθμός εμβρύων από την έγκυο μητέρα της ποικιλίας που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι μεγαλύτερος από οκτώ και θα πρέπει να είναι σχετικά σταθερός. Χρησιμοποιούνται υγιή, σεξουαλικά ώριμα ζώα.

▼B

Αριθμός ζώων

Ο αριθμός των αναγκαίων ζώων εξαρτάται από τη συχνότητα αυθόρμητης μετατόπισης και από τον ελάχιστο ρυθμό επαγωγής που απαιτείται για την επίτευξη θετικού αποτελέσματος.

Το πείραμα εκτελείται συνήθως με ανάλυση των αρσενικών απογόνων της ομάδας F_1, 500 τουλάχιστον αρσενικοί απόγονοι της ομάδας F_1 πρέπει να περιληφθούν σε κάθε ομάδα δόσης. Εάν συμπεριλαμβάνονται θηλυκοί απόγονοι της ομάδας F_l, απαιτούνται 300 αρσενικά και 300 θηλυκά.

Χρήση αρνητικών και θετικών μαρτύρων

Πρέπει να υπάρχουν επαρκή δεδομένα μαρτύρων, εξαγόμενα τόσο από τη δοκιμασία όσο και από ιστορικά στοιχεία. Όταν υπάρχουν αποδεκτά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων από πρόσφατα πειράματα στο ίδιο εργαστήριο, τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αντικαταστήσουν τη σύγχρονη χρήση θετικών μαρτύρων.

Επίπεδο δόσεων

Χρησιμοποιείται ένα επίπεδο δόσης, συνηθέστερα η υψηλότερη δόση που συνδέεται με την παραγωγή ελάχιστων τοξικών επιδράσεων αλλά χωρίς να επηρεάζει την αναπαραγωγική συμπεριφορά ή την επιβίωση. Για τον καθορισμό της σχέσης δόσης/αποτελέσματος απαιτούνται δύο πρόσθετες χαμηλότερες δόσεις. Για μη τοξικές χημικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιηθεί η έκθεση στην ανώτατη δυνατή δόση,

Διαδικασία

Αγωγή και ζευγάρωμα

Δύο προγράμματα αγωγής υπάρχουν. Η εφάπαξ χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας χρησιμοποιείται ευρύτερα. Η χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας επί 35 ημέρες με βάση την εβδομάδα επτά ημερών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί. Ο αριθμός των ζευγαρωμάτων μετά την αγωγή διέπεται από το πρόγραμμα αγωγής και πρέπει να εξασφαλίζει τη λήψη δειγμάτων από όλες τις φάσεις των γεννητικών κυττάρων που υφίστανται την αγωγή. Κατά το τέλος της περιόδου του ζευγαρώματος, τα θηλυκά τοποθετούνται σε κλωβούς χωριστά. Όταν τα θηλυκά γεννήσουν, καταγράφεται η ημερομηνία, ο αριθμός των νεογνών και το φύλο τους. Όλοι σι αρσενικοί απόγονοι απογαλακτίζονται ενώ οι θηλυκές απόγονοι απορρίπτονται, εκτός εάν συμπεριλαμβάνονται στο πείραμα.

Δοκιμασία για ετεροζυγωτικότητα μετατόπισης

Χρησιμοποιείται μία από τις δύο δυνατές μεθόδους:

— Δοκιμασία γονιμότητας των απογόνων της ομάδας F_1 και μετέπειτα επαλήθευση των πιθανών φορέων μετατόπισης με κυτταρογενετική ανάλυση.

— Κυτταρογενετική ανάλυση όλων των αρσενικών απογόνων της ομάδας F_i χωρίς προηγούμενη επιλογή με τεστ γονιμότητας.

α) Δοκιμασία γονιμότητας

Η μειωμένη γονιμότητα ενός ζώου της ομάδας F_1 μπορεί να προσδιοριστεί με την παρατήρηση του αριθμού των νεογνών ή/και την ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας των θηλυκών που έχουν ζευγαρώσει.

Τα κριτήρια προσδιορισμού της κανονικής και μειωμένης γονιμότητας καθορίζονται για το στέλεχος ποντικών που χρησιμοποιείται.

▼B

Παρατήρηση του αριθμού των νεογνών από την ίδια μητέρα: Τα αρσενικά της ομάδας F_1 που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία τοποθετούνται χωριστά σε κλωβούς με θηλυκά είτε από το ίδιο πείραμα είτε από την αποικία. Οι κλωβοί επιθεωρούνται καθημερινά, αρχίζοντας 18 ημέρες μετά το ζευγάρωμα. Ο αριθμός των νεογνών από την ίδια μητέρα και το φύλο των απογόνων της ομάδας F_2 καταγράφονται κατά τη γέννηση και εν συνεχεία τα νεογνά απορρίπτονται. Εάν εξετάζονται οι θηλυκοί απόγονοι της ομάδας F_1,οι απόγονοι F_2 των μικρών νεογνών διατηρούνται για παραπέρα δοκιμασία. Οι θηλυκοί φορείς μετατόπισης επαληθεύονται με κυτταρογενετική ανάλυση μετατόπισης σε οποιονδήποτε από τους αρσενικούς απογόνους τους. Τα θηλυκά ΧΟ αναγνωρίζονται από τη μεταβολή στην αναλογία φύλου μεταξύ των απογόνων τους από 1:1 έως 1:2 αρσενικά προς θηλυκά. Σε μία αλληλοδιάδοχη διαδικασία, τα κανονικά ζώα F_1 απομακρύνονται από παραπέρα δοκιμασία εάν η πρώτη ομάδα νεογνών από την ίδια μητέρα F_2 φθάσει ή υπερβεί την προκαθορισμένη κανονική τιμή, αλλιώς παρατηρείται μία δεύτερη ή τρίτη ομάδα νεογνών F_2 από την ίδια μητέρα.

Τα ζώα της ομάδας F_1 που δεν μπορούν να χαρακτηριστούν κανονικά μετά από παρατήρηση μέχρι τριών ομάδων νεογνών F_2, δοκιμάζονται παραπέρα με ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας των θηλυκών που υπέστησαν αγωγή ή με απευθείας υποβολή σε κυτταρογενετική ανάλυση,

Ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας: Η μείωση στον αριθμό νεογνών των φορέων μετατόπισης οφείλεται σε εμβρυϊκό θάνατο έτσι ώστε ένας υψηλός αριθμός νεκρών εμφυτευμάτων είναι ενδεικτικός για την παρουσία μετατόπισης στο δοκιμαζόμενο ζώο. Τα αρσενικά της ομάδας δοκιμής F_1, ζευγαρώνονται με δύο έως τρία θηλυκά το καθένα. Η σύλληψη προσδιορίζεται με καθημερινή επιθεώρηση για την εύρεση πηγμένου σπέρματος μέσα στον κόλπο το πρωί. Τα θηλυκά θανατώνονται μετά από 14 έως 16 ημέρες και καταγράφονται τα ζωντανά και νεκρά εμφυτεύματα μέσα στη μήτρα τους.

β) Κυτταρογενετική ανάλυση

Ετοιμάζονται παρασκευάσματα όρχεων με τη μέθοδο αφυδάτωσης, με τη βοήθεια του αέρα. Οι φορείς μετατόπισης τακτοποιούνται από την παρουσία πολυσθενών διατάξεων στη διακίνηση-μετάφαση Ι στα αρχέτυπα σπερματοκύτταρα. Η παρατήρηση δύο τουλάχιστον κυττάρων με πολυαθενή σύνδεσμο συνιστά την απαιτούμενη απόδειξη ότι το δοκιμασθέν ζώο είναι φορέας μετατόπισης.

Εάν δεν έχει γίνει επιλογή ζευγαρώματος όλα τα αρσενικά της ομάδας F_1 επιθεωρούνται κυτταρογενετικά. Πρέπει να καταγραφεί μικροσκοπικά ένας ελάχιστος αριθμός 25 διακινήσεων-μεταφάσεων Ι ανά αρσενικό. Η εξέταση των μιτωτικών μεταφάσεων, της σπερματογονίας ή του μυελού οστών απαιτείται για τα αρσενικά της ομάδας F_1 με μικρούς όρχεις και μειωτικό διαχωρισμό πριν τη διακίνηση ή από θηλυκά ΧΟ της ομάδας F_1 για τα οποία υπάρχει σχετική υποψία. Η παρουσία ασυνήθιστα μακρού ή/και βραχέως χρωμοσώματος σε κάθε ένα από τα δέκα κύτταρα αποτελεί απόδειξη ιδιαίτερης στειρωτικής μετατόπισης αρσενικού (c-t type). Μερικές μετατοπίσεις Χ-αυτοσωμικών που προκαλούν στειρότητα αρσενικών μπορεί να προσδιοριστούν μόνο με τη μέθοδο ζωνώσεως (banding) με μελέτη των μιτωτικών χρωμοσωμάτων. Η παρουσία 39 χρωμοσωμάτων και στις δέκα μιτώσεις αποτελεί απόδειξη της κατάστασης ΧΟ σε ένα θηλυκό.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα παρίστανται με μορφή πίνακα.

Ο μέσος αριθμός της ομάδας νεογνών από την ίδια μητέρα και η σχέση φύλου από μητρικά ζευγαρώματα κατά τη γέννηση και κατά τον απογαλακτισμό αναφέρονται για κάθε χρονικό διάστημα ζευγαρώματος.

▼B

Για την εκτίμηση της γονιμότητας των ζώων της ομάδας F_1 δίνονται ο μέσος αριθμός της ομάδας νεογνών από την ίδια μητέρα όλων των κανονικών ζευγαρωμάτων και οι αριθμοί χωριστά των ομάδων νεογνών F_1 από την ίδια μητέρα των φορέων μετατόπισης. Για την ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας δίνεται ο μέσος αριθμός των ζωντανών και νεκρών εμφυτευμάτων των κανονικών ζευγαρωμάτων και οι αριθμοί χωριστά των ζωντανών και νεκρών εμφυτευμάτων για κάθε ζευγάρωμα των φορέων μετατόπισης της ομάδας F_1.

Για την κυτταρογενετική ανάλυση της διακίνησης-μετάφασης I καταγράφονται οι αριθμοί των τύπων των πολυσθενών διατάξεων και ο συνολικός αριθμός κυττάρων για κάθε φορέα μετατόπισης.

Για τα στείρα ζώα της ομάδας F_1 αναγράφεται ο συνολικός αριθμός των ζευγαρωμάτων και η διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος.

Δίνονται τα βάρη των όρχεων και οι λεπτομέρειες της κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Για τα θηλυκά της ομάδας ΧΟ, αναφέρεται ο μέσος αριθμός νεογνών από την ίδια μητέρα, η αναλογία φύλου των απογόνων της ομάδας F_2 και τα αποτελέσματα της κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Εάν οι πιθανοί φορείς μετατόπισης της ομάδας F_1 προεπιλέγονται με δοκιμασίες γονιμότητας, οι πίνακες πρέπει να περιλαμβάνουν πληροφορίες για τον αριθμό εκείνων που επιβεβαιώθηκαν ότι είναι ετεροζυγώτες μετατόπισης. Τα δεδομένα από πειράματα αρνητικών ελέγχων και θετικών ελέγχων με μάρτυρες αναφέρονται κατά τον ίδιο τρόπο.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— στελέχη των ποντικών, ηλικία των ζώων, βάρη των ζώων που υπέστησαν την αγωγή,

— αριθμοί των μητρικών ζώων κάθε φύλου της ομάδας δοκιμασίας και της ομάδας μάρτυρα,

— συνθήκες της δοκιμασίας, λεπτομερής περιγραφή της αγωγής, επίπεδα δόσεων, διαλύτες, πρόγραμμα ζευγαρώματος,

— αριθμός και φύλο των απογόνων ανά θηλυκό ζώο, αριθμός και φύλο των απογόνων που αναπτύχθηκαν για ανάλυση μετατόπισης,

— χρόνος και κριτήρια ανάλυσης μετατόπισης,

— αριθμός και λεπτομερής περιγραφή των φορέων μετατόπισης, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων διατροφής και δεδομένων περιεχομένου μήτρας, εάν είναι δυνατόν,

— κυτταρογενετικές διαδικασίες και λεπτομέρειες μικροσκοπικής ανάλυσης, κατά προτίμηση με εικόνες,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

▼**B**

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β,

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

B.26. **ΔΟΚΙΜΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος μελέτης της υποχρόνιας τοξικότητας ουσιών λαμβανόμενων από το στόμα αποτελεί Επανάληψη της μεθόδου TG 408 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας χημικής ουσίας, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η υποχρόνια τοξικότητα της ουσίας λαμβανόμενης από το στόμα με επαναλαμβανόμενες δόσεις αφού πρώτα έχουν ληφθεί αρχικές πληροφορίες όσον αφορά την τοξικότητα της ουσίας με δοκιμασίες οξείας τοξικότητας ή τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης 28 ημερών. Με τη μελέτη 90 ημερών λαμβάνονται πληροφορίες για πιθανούς κινδύνους για την υγεία οι οποίοι ενδεχομένως προκύψουν λόγω επαναλαμβανόμενης έκθεσης επί παρατεταμένο χρονικό διάστημα το οποίο καλύπτει την περίοδο από την ωρίμαση μετά την αποκοπή μέχρι την ανάπτυξη έως την πλήρη ενηλικίωση. Από τη μελέτη θα προκύψουν στοιχεία για τις κύριες τοξικές επιπτώσεις καθώς και ενδείξεις για τα όργανα-στόχους και για την πιθανότητα συσσώρευσης· μπορεί επίσης να προκύψει εκτίμηση για ένα επίπεδο έκθεσης στο οποίο δεν παρατηρείται τοξική επίπτωση (no observed adverse effect level} και το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή των δόσεων για χρόνιες μελέτες και για τη θέσπιση κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση του ανθρώπου.

Στη μέθοδο δίνεται επιπλέον έμφαση στα σημεία των νευρικών απολήξεων και από αυτήν συνάγονται ενδείξεις για τις επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό και στο αναπαραγωγικό σύστημα. Υπογραμμίζεται επίσης η ανάγκη για προσεκτική κλινική παρατήρηση των ζώων, προκειμένου να ληφθεί ο μεγαλύτερος δυνατός αριθμός πληροφοριών. Η μελέτη πρέπει να επιτρέπει τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που διαθέτουν το δυναμικό πρόκλησης νευροτοξικών ή ανοσολογικών επιπτώσεων ή επιπτώσεων στα αναπαραγωγικά όργανα οι οποίες ενδεχομένως απαιτούν περαιτέρω σε βάθος διερεύνηση.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Δόση: είναι η χορηγούμενη ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος (g, mg) ή σε βάρος δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου (π.χ.mg/kg), ή σε σταθερές συγκεντρώσεις στην τροφή (ppm).

Δοσολογία: είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησης της.

NOAEL: πρόκειται για συντομογραφία του «no observed adverse effect level» και είναι η υψηλότερη δόση με την οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις σχετιζόμενες με την αγωγή.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται από το στόμα ημερησίως σε σταδιακά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων, μία δόση ανά ομάδα για χρονικό διάστημα 90 ημερών. Κατά την περίοδο χορήγησης της αγωγής, τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας υποβάλλονται σε νεκροψία και, στο τέλος της δοκιμασίας, τα επιζήσαντα ζώα θανατώνονται και επίσης υποβάλλονται σε νεκροψία.

▼B

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1. **Προετοιμασία των ζώων**

Χρησιμοποιούνται υγιή ζώα. τα οποία έχουν εγκλιματισθεί στις εργαστηριακές συνθήκες για πέντε τουλάχιστον ημέρες και δεν έχουν υποβληθεί σε προηγούμενους πειραματικούς χειρισμούς. Τα πειραματόζωα χαρακτηρίζονται με βάση το είδος, την ποικιλία, την προέλευση, το φύλο, το βάρος ή/και την ηλικία. Τα πειραματόζωα κατανέμονται με τυχαία επιλογή σε ομάδες αγωγής και ομάδες μαρτύρων. Οι κλωβοί τοποθετούνται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν επιδράσεις οφειλόμενες στον τρόπο τοποθέτησης. Σε κάθε ζώο αποδίδεται ένας μοναδικός αναγνωριστικός αριθμός.

1.4.2. **Παρασκευή των δόσεων**

Η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να χορηγείται με καθετήρα στομάχου ή στην τροφή ή στο πόσιμο νερό. Η μέθοδος χορήγησης από το στόμα εξαρτάται από το σκοπό της μελέτης και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας.

Όταν χρειάζεται, δημιουργείται διάλυμα ή εναιώρημα της δοκιμαζόμενης ουσίας σε κατάλληλο έκδοχο. Συνιστάται, όταν είναι εφικτό, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί υδατικό διάλυμα/εναιώρημα, κατόπιν διάλυμα/γαλάκτωμα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τέλος η διάλυση σε άλλα έκδοχα. Πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά των άλλων (πλήν του ύδατος) εκδόχων. Πρέπει να καθορίζεται η σταθερότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας υπό τις συνθήκες χορήγησης.

1.4.3. **Συνθήκες δοκιμασίας**

1.4.3.1. *Πειραματόζωα*

Το προτιμώμενο είδος είναι ο επίμυς (αρουραίος), παρόλο που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη τρωκτικών, π.χ. μύες. Χρησιμοποιούνται ποικιλίες νεαρών υγιών ενήλικων ζώων από αυτές που συνήθως χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να μην εγκυμονούν και να μην έχουν εγκυμονήσει στο παρελθόν. Η χορήγηση των δόσεων ξεκινά αμέσως μετά τον απογαλακτισμό και, οπωσδήποτε, πριν τα ζώα φθάσουν σε ηλικία εννέα εβδομάδων. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους ανάμεσα στα χρησιμοποιούμενα ζώα δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου. Όταν η μελέτη διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρόνιας τοξικότητας, πρέπει και στις δύο μελέτες να χρησιμοποιηθούν ζώα ίδιας ποικιλίας και προέλευσης.

1.4.3.2. *Αριθμός και φύλο*

Για κάθε δόση (επίπεδο) χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 20 ζώα (δέκα θηλυκά και δέκα αρσενικά). Εάν σχεδιάζονται θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Με βάση όσα είναι ήδη γνωστά για τη χημική ουσία ή άλλη ουσία που εμφανίζει σημαντικές με αυτήν αναλογίες, εξετάζεται η περίπτωση να περιληφθεί πρόσθετη δορυφορική ομάδα δέκα ζώων (πέντε ανά ψύλο), στην ομάδα των μαρτύρων και στην ομάδα της υψηλότερης δόσης για να διαπιστωθεί κατά πόσον οι τοξικές επιπτώσεις εμμένουν ή αναστρέφονται μετά την περίοδο της αγωγής. Η διάρκεια της μετά την αγωγή περιόδου καθορίζεται με κατάλληλο τρόπο, ανάλογα με τις επιπτώσεις που θα παρατηρηθούν.

▼B

1.4.3.3. *Δόσεις*

Χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον διαφορετικές δόσεις και ένας μάρτυρας, πλην των περιπτώσεων όπου εκτελείται οριακή δοκιμή (βλέπε 1.4.3.4). Η επιλογή των δόσεων μπορεί να βασιστεί στα αποτελέσματα μελετών επαναλαμβανόμενης δόσης ή εντοπισμού εύρους τιμών και πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα διαθέσιμα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που αφορούν τη δοκιμαζόμενη ουσία ή συναφείς ουσίες. Εκτός από τις περιπτώσεις όπου οι φυσικοχημικές ιδιότητες ή οι βιολογικές επιπτώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν το επιτρέπουν, η υψηλότερη δόση επιλέγεται με σκοπό να επιφέρει τοξικότητα αλλά όχι τον θάνατο ή έντονη οδύνη. Επιλέγεται σειρά ελαττούμενων δόσεων έτσι ώστε αφενός να καταδειχθεί η σχέση της απόκρισης με τη δόση και αφετέρου η χαμηλότερη δόση να αποτελεί επίπεδο έκθεσης χωρίς τοξική επίδραση (NOAEL). Συχνά, η καλύτερη επιλογή για τον καθορισμό των ελαττούμενων δόσεων είναι τα υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα μεταξύ δόσεων και πολλές φορές είναι προτιμότερο να προστεθεί μια τέταρτη ομάδα δοκιμασίας παρά να είναι τα διαστήματα μεταξύ των δόσεων εξαιρετικά μεγάλα (π.χ. με συντελεστή μεγαλύτερο από 6 έως 10).

Οι μάρτυρες είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα προοριζόμενη για τον έλεγχο του εκδόχου, εφόσον χρησιμοποιείται έκδοχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκτός από το ότι δεν τους χορηγείται η υπό δοκιμή ουσία, κατά τα άλλα οι μάρτυρες υπόκεινται στους ίδιους ακριβώς χειρισμούς με τα ζώα των ομάδων αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο, ο όγκος εκδόχου που χορηγείται στους μάρτυρες είναι ο μεγαλύτερος που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής. Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στην τροφή, και προκαλεί μείωση της πρόσληψης τροφής, τότε ίσως είναι χρήσιμη μια επιπλέον ομάδα μαρτύρων υποβαλλόμενη στην ίδια δίαιτα προκειμένου να γίνει διαχωρισμός μεταξύ της μείωσης για γευστικούς λόγους και της μείωσης λόγω τοξικολογικής επίδρασης στο δοκιμαστικό μοντέλο.

Εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του εκδόχου και άλλων προσθέτων, όπου χρησιμοποιούνται: επιπτώσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στο μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της υπό δοκιμή ουσίας, επιπτώσεις στις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και επιπτώσεις στην κατανάλωση τροφής ή ύδατος ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων.

1.4.3.4. *Οριακή δοκιμή*

Εάν δοκιμή με δόση ισοδύναμη τουλάχιστον με 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, με τη διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια, δεν προκαλέσει εμφανείς τοξικές επιπτώσεις, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση τοξικότητας με βάση στοιχεία για ουσίες παρόμοιας δομής, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρεις διαφορετικές δόσεις. Η οριακή δοκιμή δεν' εφαρμόζεται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες δεδομένα που αφορούν την έκθεση του ανθρώπου δείχνουν ότι είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί υψηλότερη δόση.

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. **Χορήγηση των δόσεων**

Στα ζώα χορηγείται η υπό δοκιμή ουσία καθημερινά, εφτά ημέρες την εβδομάδα επί 90 ημέρες. Κάθε άλλο καθεστώς χορήγησης, π.χ. πέντε ημέρες την εβδομάδα, πρέπει να αιτιολογείται. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στα ζώα με καθετήρα, χορηγείται σε εφάπαξ δόση με στομαχικό σωλήνα ή με άλλη κατάλληλη διασωλήνωση. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, εκτός από τις περιπτώσεις υδατικών διαλυμάτων όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν 2 ml/100 g βάρους σώματος. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερες επιπτώσεις σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο πρέπει να ελαχιστοποιούνται με προσαρμογή της συγκέντρωσης ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλες τις δόσεις.

▼B

Για τις ουσίες που χορηγούνται μέσω της τροφής ή του πόσιμου ύδατος, μεριμνάται ώστε οι απαιτούμενες ποσότητες της υπό δοκιμή ουσίας να μην επηρεάζουν την κανονική διατροφική ή υδατική ισορροπία. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με την τροφή, χρησιμοποιείται είτε η σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (ppm) είτε η σταθερή δόση εκφρασμένη επί του βάρους του σώματος του ζώου. Άλλος εναλλακτικός τρόπος, εάν χρησιμοποιηθεί, ορίζεται με λεπτομέρειες. Για ουσίες που χορηγούνται με καθετηρίαση, η χορήγηση γίνεται τις ίδιες περίπου ώρες κάθε ημέρα και οι δόσεις προσαρμόζονται ώστε η δόση σε αναλογία με το βάρος σώματος του ζώου να διατηρείται σταθερή. Όταν η μελέτη 90 ημερών διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρόνιας τοξικότητας, χρησιμοποιείται και στις δύο μελέτες παρόμοια δίαιτα.

1.5.2. **Παρατηρήσεις**

Η ελάχιστη περίοδος παρατήρησης είναι 90 ημέρες. Τα ζώα των δορυφορικών ομάδων που έχουν προβλεφθεί για μετέπειτα παρατήρηση κρατούνται για ορισμένο χρόνο χωρίς αγωγή για να διαπιστωθεί κατά πόσον οι τοξικές επιπτώσεις παραμένουν ή έχουν εκλείψει.

Τα ζώα υποβάλλονται σε γενική κλινική παρατήρηση τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, κατά προτίμηση την ίδια ώρα, με συνεκτίμηση του σημείου αιχμής των επιπτώσεων που αναμένονται μετά τη χορήγηση της δόσης. Καταγράφεται η κλινική κατάσταση των ζώων. Τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα, συνήθως στην αρχή και στο τέλος κάθε ημέρας, όλα τα ζώα εξετάζονται για σημεία νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Τουλάχιστον μία φορά πριν την πρώτη έκθεση (ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση κάθε πειραματόζωου με την προ της δοκιμής κατάστασή του}, και μία φορά την εβδομάδα στη συνέχεια, εκτελείται λεπτομερής κλινική παρατήρηση όλων των ζώων. Οι παρατηρήσεις γίνονται εκτός των κλωβών, κατά προτίμηση στο ίδιο πάντα μέρος και την ίδια περίπου ώρα κάθε φορά. Καταγράφονται προσεκτικά, κατά προτίμηση με βάση κάποιο σύστημα βαθμολόγησης, που έχει οριστεί από το εργαστήριο. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να είναι ελάχιστες οι διαφορές στις συνθήκες παρατήρησης. Τα συμπτώματα που καταγράφονται περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες, εμφάνιση εκκρίσεων και απεκκρίσεων και αυτόνομης δραστηριότητας (π.χ. δακρύρροια, όρθωση τριχών, μέγεθος οφθαλμικής κόρης, ασυνήθης αναπνοή). Τυχόν μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση του σώματος ή στην ανταπόκριση στο χειρισμό καθώς και εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεοτυπίας (π.χ. υπερβολική αυτοπεριποίηση, επαναλαμβανόμενη κυκλική βάδιση) ή παράξενης συμπεριφοράς (π.χ. αυτοακρωτηριασμός, οπισθοβάδιση) καταγράφονται επίσης (1).

Η οφθαλμολογική εξέταση, με χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, διενεργείται πριν από τη χορήγηση της υπο δοκίμή ουσίας και στο τέλος της μελέτης, κστά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Γάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, εξετάζονται όλα τα ζώα.

Κατά το τέλος της περιόδου έκθεσης και οπωσδήποτε όχι πριν την 11η εβδομάδα, εκτελείται αξιολόγηση της αισθητηριακής ανταπόκρισης σε διαφορετικών ειδών ερεθίσματα (1) (π.χ. ακουστικά, οπτικά και ιδιοδεκτικά ερεθίσματα) (2), (3), (4), αξιολόγηση της δύναμης λαβής (5) και αξιολόγηση της μυϊκής δραστηριότητας (6). Λεπτομερέστερη περιγραφή των διαδικασιών που μπορούν να ακολουθηθούν δίνονται στις αντίστοιχες βιβλιογραφικές παραπομπές. Εναλλακτικές διαδικασίες, διαφορετικές από τις περιγραφόμενες στις βιβλιογραφικές παραπομπές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης.

Είναι δυνατόν να παραλειφθούν οι παρατηρήσεις για λειτουργικές διαταραχές, οι οποίες εκτελούνται κατά το τέλος της μελέτης όταν υπάρχουν διαθέσιμα σχετικά δεδομένα από άλλες μελέτες και δεν έχουν διαπιστωθεί λειτουργικές ανωμαλίες κατά τις καθημερινές κλινικές παρατηρήσεις.

▼B

Κατ' εξαίρεση, τέτοιες παρατηρήσεις μπορούν επίσης να παραλειφθούν για τις ομάδες οι οποίες εμφανίζουν σημεία τοξικότητας τέτοιας έντασης ώστε να επηρεάζεται σημαντικά η εκτέλεση της λειτουργικής δοκιμασίας.

1.5.2.1. *Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής/ύδατος*

Τα ζώα ζυγίζονται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η κατανάλωση τροφής μετρείται σε εβδομαδιαία τουλάχιστον βάση. Εάν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στο πόσιμο νερό, η κατανάλωση ύδατος επίσης μετρείται σε εβδομαδιαία τουλάχιστον βάση. Η κατανάλωση ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη στις μελέτες με χορήγηση της ουσίας στην τροφή ή με καθετηρίαση κατά τις οποίες η δραστηριότητα πόσης μπορεί να μεταβληθεί.

1.5.2.2. *Αιματολογικές εξετάσεις και κλινική βιοχημεία*

Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο και αποθηκεύονται, κατά περίπτωση, υπό κατάλληλες συνθήκες. Στο τέλος της περιόδου δοκιμής, τα δείγματα συλλέγονται αμέσως πριν τη διαδικασία θανάτωσης των ζώων ή στο πλαίσιο της διαδικασίας αυτής.

Στο τέλος της περιόδου δοκιμής και αφού έχουν συλλεχθεί τυχόν ενδιάμεσα δείγματα αίματος εκτελούνται οι εξής αιματολογικές εξετάσεις: μέτρηση αιματοκρίτη, συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, αριθμού αιμοπεταλίων και μέτρηση του χρόνου/δυναμικού πήξης του αίματος.

Κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός για τη διερεύνηση κύριων τοξικών επιπτώσεων στους ιστούς και ειδικότερα για επιπτώσεις στο νεφρό και στο ήπαρ εκτελείται στα δείγματα αίματος που λαμβάνονται από κάθε ζώο ακριβώς πριν τη διαδικασία θανάτωσης ή στο πλαίσιο της διαδικασίας αυτής (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα ζώα ή/και όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει). Όπως και για τις αιματολογικές εξετάσεις, για τις κλινικές βιοχημικές δοκιμές εκτελούνται ενδιάμεσες αιμοληψίες. Συνιστάται να παραμένουν νηστικά τα ζώα τη νύχτα που προηγείται της αιμοληψίας ([1]). Στο πλάσμα ή στον ορό προσδιορίζονται οπωσδήποτε τα εξής: νάτριο, κάλιο, γλυκόζη, συνολική χοληστερίνη, ουρία, άζωτο ουρίας του αίματος, κρεατινίνη, συνολική πρωτεΐνη και αλβουμίνη και περισσότερα από δύο ένζυμα ενδεικτικά των ηπατοκυτταμικών επιπτώσεων (όπως η αμινοτρανσφεράση της αλανίνης, η αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος, η αλκαλική φωσφατάση, η γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση και η δεσυδρογονάση της σερβιτόλης). Μετρήσεις πρόσθετων ενζύμων (ηπατικής ή άλλης προέλευσης) και οξέων της χολής, οι οποίες μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες υπό ορισμένες συνθήκες, είναι δυνατό να συμπεριληφθούν.

Προαιρετικά, κατά την τελευταία εβδομάδα της μελέτης, μπορούν να εκτελεστούν οι ακόλουθες αναλύσεις ούρων σε δείγματα τα οποία συλλέγονται σε προκαθορισμένο χρόνο: εμφάνιση, όγκος, οσμωτική ικανότητα ή ειδικό βάρος, pH, πρωτεΐνη, γλυκόζη και αίμα/αιματοκύτταρα.

Επιπλέον, εξετάζεται κατά πόσο είναι σκόπιμο να μελετηθούν οι ορολογικοί δείκτες για τις γενικής φύσεως βλάβες που έχουν υποστεί οι ιστοί. Άλλοι προσδιορισμοί που εκτελούνται εάν οι γνωστές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας μπορούν να επηρεάσουν ή υπάρχει η υποψία ότι επηρεάζουν σχετικά μεταβολικά προφίλ περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό ασβεστίου, φωσφόρου, τριγλυκεριδίων μετά από νηστεία, ειδικών ορμονών, μεθαιμοσφαιρίνης και χολινεστεράσης. Λυτοί οι προσδιορισμοί εκτελούνται για χημικές ουσίες ορισμένων κατηγοριών ή κατά περίπτωση.

([1]) Για πολλές μετρήσεις στον ορό και στο πλάσμα, ιδίως για τη γλυκόζη, προτιμάται η ολονύκτια νηστεία. Κυριότερες λόγοι, γι' αυτό είναι ότι η αυξημένη διακύμανση των τιμών, αναπόφευκτη αν τα ζώα δεν υποβληθούν σε νηστεία, θα τείνει να καλύψει λεπτότερες επιπτώσεις και να δυσχεράνει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η ολονύκτια όμως νηστεία μπορεί να επηρεάσει τον γενικό μεταβολισμό των ζώων και, ιδίως στις μελέτες όπου η ουσία χορηγείται στη δίαιτα, μπορεί να διαταράζει την ημερήσια έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία. Όταν επιλέγεται ολονύκτια νηστεία, ο κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός τρέπει να εκτελείται μετά τη διεξαγωγή των λειτουργικών παρατηρήσεων.

▼B

Γενικά, απαιτείται ευέλικτη προσέγγιση, εξαρτώμενη από τα είδη και την παρατηρούμενη ή/και αναμενόμενη επίπτωση μιας δεδομένης ουσίας.

Εάν τα ιστορικά στοιχεία αναφοράς δεν είναι κατάλληλα, εξετάζεται κατά πόσο χρειάζεται να προσδιοριστούν οι αιματολογικές και κλινικές βιοχημικές μεταβλητές πριν αρχίσει η χορήγηση της ουσίας. Κατά κανόνα, δεν συνιστάται προσδιορισμός αυτών των δεδομένων πριν τη χορήγηση της αγωγής (7).

1.5.2.3. *Μακροσκοπική νεκροψία*

Όλα τα ζώα της μελέτης υποβάλλονται σε πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των φυσικών στομίων του σώματος καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου αυτών. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, οι όρχεις, οι επιδιδυμίδες, η μήτρα, οι ωοθήκες, ο θύμος, η σπλήνα, ο εγκέφαλος και η καρδιά όλων των ζώων (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα ή/και όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει) καθαρίζονται από τυχόν άλλους προσκολλημένους ιστούς, όπως ενδείκνυται, και ζυγίζονται υγρά αμέσως μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση.

Οι ακόλουθοι ιστοί διατηρούνται σε στερεωτικό μέσο κατάλληλο και για τον τύπο ιστού και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης στο οποίο ενδεχομένως υποβληθεί ο εν λόγω ιστός στο μέλλον: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο εγκέφαλος (αντιπροσωπευτικές περιοχές στις οποίες περιλαμβάνονται το άνω τμήμα του εγκεφάλου, η παρεγκεφαλίδα και ο μυελός/γέφυρα), ο νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός), η υπόφυση, ο θυρεοειδής, ο παραθυρεοειδής, ο θύμος, ο οισοφάγος, οι σιελογόνοι αδένες, ο στόμαχος, το λεπτό και το παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων των κηλίδων του Peyer), το ήπαρ, το πάγκρεας, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, η σπλήνα, η καρδιά, η τραχεία και οι πνεύμονες (για να διατηρηθούν καταρχάς διογκώνονται με το στερεωτικό και κατόπιν βυθίζονται σε αυτό), η αορτή, οι γονάδες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, ο μαστικός αδένας θήλεος, ο προστάτης, η ουροδόχος κύστη, η χοληδόχος κύστη, οι λεμφαδένες (κατά προτίμηση ένας λεμφαδένας που καλύπτει την οδό χορήγησης και ένας άλλος, απομακρυσμένος ως προς την οδό χορήγησης, ο οποίος καλύπτει τις επιπτώσεις στη συστηματική κυκλοφορία), το περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο) κατά προτίμηση κοντά στο μυ, τμήμα του μυελού οστού (ή/και νωπός μυελός οστού λαμβανόμενος με αναρρόφηση), δέρμα και οφθαλμοί (εάν έχουν παρατηρηθεί αλλαγές κατά τις οφθαλμολογικές εξετάσεις). Κλινικά και άλλα ευρήματα ενδεχομένως υποδεικνύουν ότι 9α πρέπει να εξεταστούν και άλλοι πρόσθετοι ιστοί. Διατηρούνται επίσης και όλα τα όργανα τα οποία, με βάση τις ήδη γνωστές ιδιότητες της δοκιμαζόμενης ουσίας, ενδέχεται να αποτελούν όργανα στόχους.

1.5.2.4. *Ιστοπαθολογία*

Διεξάγεται πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση στα διατηρημένα όργανα και στους ιστούς όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες των μαρτύρων και στις ομάδες υψηλής δόσης. Οι εν λόγω εξετάσεις επεκτείνονται στα ζώα των ομάδων όλων των άλλων δόσεων εάν στην ομάδα υψηλής δόσης έχουν παρατηρηθεί αλλαγές σχετιζόμενες με την αγωγή.

Εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές βλάβες.

Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, εκτελείται ιστοπαθολογική εξέταση στους ιστούς και στα όργανα τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν επιπτώσεις στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ**

2.1. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Για κάθε ζώο παρέχονται αναλυτικά στοιχεία. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφαίνονται, για κάθε ομάδα δοκιμής ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο αριθμός των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ή θανατώθηκαν για ανθρωπιστικούς λόγους και ο χρόνος θανάτου ή θανάτωσης, ο αριθμός αυτών που εμφάνισαν τοξικότητα, περιγραφή των συμπτωμάτων τοξικότητας (χρόνος εμφάνισης, διάρκεια και σοβαρότητα των τοξικών επιπτώσεων), αριθμός ζώων που εμφανίζουν βλάβες, τι είδους βλάβες και ποσοστό ζώων που εμφανίζουν κάθε είδους βλάβη.

Τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με κατάλληλη και γενικώς αποδεκτέ] στατιστική μέθοδο. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα επιλέγονται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

2.2. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1. **Υπό δοκιμή ουσία:**

— φυσική μομφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά,

— αναγνωριστικά στοιχεία,

— έκδοχο (όπου απαιτείται): αιτιολόγηση της επιλογής του εκδόχου, όταν δεν είναι το νερό.

2.2.2. **Είδος πειραματόζωου:**

— χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, δίαιτα κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου στην αρχή της δοκιμασίας.

2.2.3. **Συνθήκες δοκιμής:**

— σκεπτικό επιλογής των δόσεων,

— λεπτομέρειες σχηματισμού της υπό δοκιμή ουσίας/της προετοιμασίας της τροφής, επιτευχθείσα συγκέντρωση, σταθερότητα και ομογένεια του παρασκευάσματος,

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,

— πραγματικές δόσεις (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή ή στο πόσιμο νερό στην πραγματική δόση, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού.

2.2.4. **Αποτελέσματα:**

— βάρος σώματος και αλλαγές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής και κατανάλωση ύδατος, εφόσον εφαρμόζεται,

— δεδομένα τοξικών αποκρίσεων ανά δόση και φύλο, συμπεριλαμβανόμενων ενδείξεων τοξικότητας,

▼B

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (είτε είναι αναστρέψιμες είτε όχι),

— αποτελέσματα οφθαλμολογικής εξέτασης,

— αξιολόγηση αισθητηριακής δραστηριότητας, δύναμης λαβής και κινητικής δραστηριότητας (όταν υπάρχουν),

— αιματολογικές δοκιμασίες με σχετικές τιμές αναφοράς,

— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις με σχετικές τιμές αναφοράς,

— τελικό βάρος σώματος, βάρος οργάνων και λόγος βάρους οργάνων/βάρος σώματος,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερής περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στοιχεία απορρόφησης εάν είναι διαθέσιμα,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό.

Σχολιασμός των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999-1003.

(3) Gad, S. C. (1982). Λ Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology.). Toxicol. Environ. Health, 9. pp. 691-704.

(4) Moser, V. C, Mc Daniel, K. M.. Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267-283.

(5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd \V. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233-236.

(6) Crofton K. M., Howard]. L., Moser V. C, Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599-609.

(7) Weingand K., Brown C, Hall R. et al. (1996). «Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies», Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198-201.

▼B

B.27. **ΔΟΚΙΜΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ ΣΕ ΜΗ ΤΡΩΚΤΙΚΑ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η περιγραφόμενη μέθοδος δοκιμής της υποχρόνιας τοξικότητας ουσιών λαμβανόμενων από το στόμα αποτελεί αντιγραφή της μεθόδου TG 409 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας ουσίας, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η υποχρόνια τοξικότητα της ουσίας λαμβανόμενης από το στόμα με επαναλαμβανόμενες δόσεις αφού πρώτα έχουν ληφθεί αρχικές πληροφορίες όσον αφορά την τοξικότητα της ουσίας με δοκιμασίες οξείας τοξικότητας ή τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης *28* ημερών. Με τη μελέτη 90 ημερών λαμβάνονται πληροφορίες για πιθανούς κινδύνους για την υγεία οι οποίοι ενδεχομένως προκύψουν λόγω επαναλαμβανόμενης έκθεσης κατά το χρονικό διάστημα ταχείας ανάπτυξης και έως την αρχή της ενηλικίωσης. Από τη μελέτη θα προκύψουν στοιχεία για τις κύριες τοξικές επιπτώσεις καθώς και ενδείξεις για τα όργανα-στόχους και για την πιθανότητα συσσώρευσης· μπορεί επίσης να προκύψει εκτίμηση για ένα επίπεδο έκθεσης στο οποίο δεν παρατηρείται τοξική επίπτωση (no observed adverse effect level) και το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή των δόσεων για χρόνιες μελέτες και για τη θέσπιση κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση του ανθρώπου.

Η μέθοδος δοκιμής επιτρέπει τον προσδιορισμό σε μη τρωκτικά των παρενεργειών από την έκθεση σε χημικές ουσίες και πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο:

— όταν οι παρατηρούμενες σε άλλες μελέτες επιπτώσεις υποδεικνύουν την ανάγκη για διασάφηση/χαρακτηρισμό σε ένα δεύτερο είδος, μη τρωκτικό, ή

— όταν μελέτες τοξικοκινητικότητας δείχνουν ότι η χρήση ενός ειδικού είδους το οποίο δεν ανήκει στα τρωκτικά είναι η καταλληλότερη επιλογή εργαστηριακού ζώου ή

— όταν άλλοι ειδικοί λόγοι αιτιολογούν τη χρήση μη τρωκτικού είδους.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Δόση: είναι η χορηγούμενη ποσότητα δοκιμαζόμενης ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος (g, mg) ή σε βάρος δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου (π.χ. mg/kg), ή σε σταθερές συγκεντρώσεις στη δίαιτα **(ppm).**

Δοσολογία: είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησης της.

NOAEL: πρόκειται για συ\τομογραφία του «no observed adverse effect level» και είναι η υψηλότερη δόση στην οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις σχετιζόμενες με την αγωγή.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα ημερησίως σε σταδιακά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων, μία δόση (ένα επίπεδο συγκέντρωσης) ανά ομάδα για χρονικό διάστημα 90 ημερών. Κατά την περίοδο χορήγησης της αγωγής, τα ζώα παρατηρούνται εντατικά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας υποβάλλονται σε νεκροψία και, στο τέλος της δοκιμασίας, τα επιζήσαντα ζώα θανατώνονται και επίσης υποβάλλονται σε νεκροψία.

▼B

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1. **Επιλογή είδους πειραματόζωου**

Το συνήθως χρησιμοποιούμενο είδος μη τρωκτικού πειραματόζωου είναι ο σκύλος, και πρέπει να είναι καθορισμένης ποικιλίας συχνά χρησιμοποιείται το εγγλέζικο λαγωνικό (beagle). Άλλα είδη όπως ο χοίρος και τα χοιρίδια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν. Η χρήση πρωτευόντων θηλαστικών δεν συνιστάται και θα πρέπει να αιτιολογείται. Χρησιμοποιούνται νεαρά υγιή ζώα και στην περίπτωση του σκύλου η αγωγή ξεκινά κατά προτίμηση στην ηλικία των 4-6 μηνών και όχι αργότερα από την ηλικία των 9 μηνών. Όταν η μελέτη διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρόνιας τοξικότητας πρέπει και στις δύο μελέτες να χρησιμοποιηθούν το ίδιο είδος και ποικιλία.

1.4.2. **Προετοιμασία των ζώων**

Χρησιμοποιούνται νεαρά υγιή ζώα, τα οποία έχουν Εγκλιματισθεί στις εργαστηριακές συνθήκες και δεν έχουν υποβληθεί σε προηγούμενους πειραματικούς χειρισμούς. Η διάρκεια εγκλιματισμού εξαρτάται από το είδος και την προέλευσή του. Συνιστάται χρόνος τουλάχιστον πέντε ημερών για σκύλους ή χοίρους που έχουν ανατραφεί για το σκοπό αυτό σε μόνιμη αποικία και τουλάχιστον δύο εβδομάδων για τα ζώα εξωτερικής προέλευσης. Τα πειραματόζωα χαρακτηρίζονται με βάση το είδος, την ποικιλία, την προέλευση, το φύλο, το βάρος ή/και την ηλικία. Τα πειραματόζωα κατανέμονται με τυχαία επιλογή σε ομάδες αγωγής και ομάδες μαρτύρων. Οι κλωβοί διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν πιθανές επιδράσεις οφειλόμενες στη θέση των κλωβών. Σε κάθε ζώο αποδίδεται ένας μοναδικός αναγνωριστικός αριθμός.

1.4.3. **Παρασκευή των δόσεων**

Οι υπό δοκιμή ουσίες μπορεί να χορηγούνται μέσα στην τροφή ή στο πόσιμο νερό, με στοματική καθετηρίαση ή σε κάψουλες. Η μέθοδος χορήγησης από το στόμα εξαρτάται από τον σκοπό της μελέτης και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του υλικού της δοκιμής.

Όταν χρειάζεται, δημιουργείται διάλυμα ή εναιώρημα της δοκιμαζόμενης ουσίας σε κατάλληλο έκδοχο. Συνιστάται, όταν είναι εφικτό, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί υδατικό διάλυμα/εναιώρημα, κατόπιν διάλυμα/γαλάκτωμα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τέλος η διάλυση σε άλλα έκδοχα. Πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά των άλλων (πλην του ύδατος) εκδόχων. Πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας στις συνθήκες χορήγησης.

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. **Αριθμός και ηλικία των ζώων**

Για κάθε δόση χρησιμοποιούνται τουλάχιστον οκτώ ζώα (τέσσερα θηλυκά και τέσσερα αρσενικά). Εάν προβλέπονται θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός αυξάνεται ανάλογα κατά τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Ο αριθμός ζώων με την ολοκλήρωση της μελέτης πρέπει να είναι επαρκής για ουσιαστική αξιολόγηση των τοξικών επιπτώσεων. Με βάση όσα είναι ήδη γνωστά για τη χημική ουσία ή άλλη ουσία ανάλογη αυτής, πρέπει να εξετάζεται η περίπτωση να περιληφθεί πρόσθετη δορυφορική ομάδα οκτώ ζώων (τεσσάρων ανά φύλο), στην ομάδα των μαρτύρων και στην ομάδα της υψηλότερης δόσης για να διαπιστωθεί κατά πόσον οι τοξικές επιπτώσεις εμμένουν ή αναστρέφονται μετά την περίοδο της αγωγής. Η διάρκεια της μετά την αγωγή περιόδου καθορίζεται με κατάλληλο τρόπο, ανάλογα με τις επιπτώσεις που θα παρατηρηθούν.

▼B

1.5.2. **Δοσολογία**

Χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον διαφορετικές δόσεις και ταυτόχρονα ένας μάρτυρας, εκτός από τις περιπτώσεις οριακής δοκιμής (βλέπε 1.5.3). Η επιλογή των δόσεων μπορεί να βασιστεί στα αποτελέσματα μελετών επαναλαμβανόμενης δόσης ή εντοπισμού εύρους τιμών και πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα διαθέσιμα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που αφορούν τη δοκιμαζόμενη ουσία ή συναφείς ουσίες. Εκτός από τις περιπτώσεις όπου οι φυσικοχημικές ιδιότητες ή οι βιολογικές επιπτώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν το επιτρέπουν, η υψηλότερη δόση επιλέγεται με σκοπό να επιφέρει τοξικότητα αλλά όχι τον θάνατο ή έντονη οδύνη. Επιλέγεται σειρά ελαττούμενων δόσεων με τρόπο ώστε αφενός να καταδειχθεί η σχέση της απόκρισης με τη δόση και αφετέρου η χαμηλότερη δόση να αποτελεί επίπεδο έκθεσης χωρίς τοξική επίδραση (NOAEL). Συχνά, η καλύτερη επιλογή για τον καθορισμό των ελαττούμενων δόσεων είναι τα υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα μεταξύ δόσεων και πολλές φορές είναι προτιμότερο να προστεθεί μία τέταρτη ομάδα δοκιμασίας παρά να είναι τα διαστήματα μεταξύ των δόσεων εξαιρετικά μεγάλα (π.χ. με συντελεστή μεγαλύτερο από 6 έως 10).

Η ομάδα των μαρτύρων είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα έλεγχου του εκδόχου όταν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκτός από το ότι δεν τους χορηγείται η υπό δοκιμή ουσία, κατά τα άλλα οι μάρτυρες υπόκεινται στους ίδιους ακριβώς χειρισμούς με τα ζώα των ομάδων αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο, οι μάρτυρες λαμβάνουν το έκδοχο στον μέγιστο όγκο από αυτούς που χρησιμοποιούνται στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή. Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται στην τροφή, και προκαλεί μείωση της πρόσληψης τροφής, τότε ίσως είναι χρήσιμη μια ομάδα μαρτύρων που υποβάλλεται στην ίδια δίαιτα προκειμένου να γίνει διαχωρισμός μεταξύ της μείωσης για γευστικούς λόγους και της μείωσης λόγω τοξικής επίπτωσης στο δοκιμαστικό μοντέλο.

Πρέπει να εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του εκδόχου και άλλων προσθέτων, όπου χρησιμοποιούνται: Επιπτώσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στο μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της υπό δοκιμή ουσίας, επιπτώσεις στις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά αυτής και επιπτώσεις στην κατανάλωση τροφής ή ύδατος ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων.

1.5.3. **Οριακή δοκιμή**

Εάν δοκιμή με δόση ισοδύναμη τουλάχιστον με 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, με τη διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια, δεν προκαλέσει εμφανείς τοξικές επιπτώσεις, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση τοξικότητας με βάση στοιχεία για ουσίες παρόμοιας δομής, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρεις διαφορετικές δόσεις. Η οριακή δοκιμή δεν εφαρμόζεται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες δεδομένα που αφορούν την έκθεση του ανθρώπου δείχνουν ότι είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί υψηλότερη δόση.

1.5.4. **Χορήγηση των δόσεων**

Στα ζώα χορηγείται η δοκιμαζόμενη ουσία καθημερινά, εφτά ημέρες την εβδομάδα επί 90 ημέρες. Κάθε άλλο καθεστώς χορήγησης, π.χ. πέντε ημέρες την εβδομάδα, πρέπει να αιτιολογείται. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στα ζώα με καθετήρα, χορηγείται σε εφάπαξ δόση με στομαχικό σωλήνα ή με άλλη κατάλληλη διασωλήνωση. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Συνήθως ο όγκος πρέπει να παραμένει ο μικρότερος δυνατός. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο ελαχιστοποιούνται με προσαρμογή της συγκέντρωσης ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλες τις δόσεις.

▼B

Για τις ουσίες που χορηγούνται μέσω της τροφής ή του πόσιμου ύδατος, μεριμνάτε ώστε οι απαιτούμενες ποσότητες της υπό δοκιμή ουσίας να μην επηρεάζουν την κανονική διατροφική ή υδατική ισορροπία. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με την τροφή, χρησιμοποιείται είτε η σταθερή συγκέντρωση στην δίαιτα (ppm) είτε η σταθερή δόση εκφρασμένη επί του βάρους του σώματος του ζώου. Εάν χρησιμοποιηθεί άλλος εναλλακτικός τρόπος, ορίζεται με λεπτομέρειες. Για ουσίες που χορηγούνται με καθετηρίαση ή με κάψουλα, η χορήγηση γίνεται τις ίδιες περίπου ώρες κάθε μέρα και οι δόσεις προσαρμόζονται ώστε η δόση σε αναλογία με το βάρος σώματος του ζώου να διατηρείται σταθερή. Όταν η μελέτη 90 ημερών διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρόνιας τοξικότητας, χρησιμοποιείται και στις δύο μελέτες παρόμοια δίαιτα.

1.5.5. **Παρατηρήσεις**

Η ελάχιστη περίοδος παρατήρησης είναι 90 ημέρες. Τα ζώα των δορυφορικών ομάδων που έχουν προβλεφθεί για παρατηρήσεις των επακόλουθων επιπτώσεων διατηρούνται για κατάλληλο χρονικό διάστημα χωρίς αγωγή, ώστε να εξακριβωθεί η ανάρρωση από τις τοξικές επιπτώσεις ή η εμμονή τους.

Τα ζώα υποβάλλονται σε γενική κλινική παρατήρηση τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, κατά προτίμηση την ίδια ώρα, με συνεκτίμηση του σημείου αιχμής των συμπτωμάτων που αναμένονται μετά τη χορήγηση της δόσης. Καταγράφεται η κλινική κατάσταση των ζώων. Τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα, συνήθως στην αρχή και στο τέλος κάθε μέρας, όλα τα ζώα εξετάζονται για σημεία νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Τουλάχιστον μία φορά πριν την πρώτη έκθεση (ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση κάθε πειραματόζωου με την προ της δοκιμής κατάστασή του), και μία φορά την εβδομάδα στη συνέχεια, εκτελείται λεπτομερής κλινική παρατήρηση όλων των ζώων. Οι παρατηρήσεις γίνονται εκτός των κλωβών, κατά προτίμηση στο ίδιο πάντα μέρος και την ίδια περίπου ώρα κάθε φορά. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να είναι ελάχιστες οι διαφορές στις συνθήκες παρατήρησης. Καταγράφονται προσεκτικά τα συμπτώματα τοξικότητας, ο χρόνος έναρξης, ο βαθμός και η διάρκειά τους. Τα συμπτώματα που καταγράφονται πρέπει να περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες, εμφάνιση εκκρίσεων και απεκκρίσεων και αυτόνομης δραστηριότητας (π.χ. δακρύρροια, όρθωση τριχών, μέγεθος οφθαλμικής κόρης, ασυνήθης αναπνοή). Τυχόν μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση του σώματος ή στην ανταπόκριση στο χειρισμό καθώς και εμφάνιση κλονικών (κινήσεις με τη μορφή νευρικού τικ) ή τονικών κινήσεων, στερεοτυπίας (π.χ. υπερβολική αυτοπεριποίηση, επαναλαμβανόμενη κυκλική βάδιση) ή παράξενης συμπεριφοράς καταγράφονται επίσης.

Η οφθαλμολογική εξέταση, με χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, διενεργείται πριν από τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας και στο τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, εξετάζονται όλα τα ζώα.

1.5.5.1. *Βάρος πώματος και κατανάλωση τροφής/ύδατος*

Τα ζώα ζυγίζονται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η κατανάλωση τροφής μετρείται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Εάν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στο πόσιμο νερό, η κατανάλωση ύδατος επίσης μετρείται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η κατανάλωση ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη στις μελέτες με χορήγηση της ουσίας στην τροφή ή με στομαχικό καθετηριασμό κατά τις οποίες μπορεί να σημειωθούν μεταβολές στην πόση.

▼B

1.5.5.2. *Αιματολογικές εξετάσεις και κλινική βιοχημεία*

Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο και αποθηκεύονται, κατά περίπτωση, υπό κατάλληλες συνθήκες. Στο τέλος της περιόδου δοκιμής, τα δείγματα συλλέγονται αμέσως πριν τη διαδικασία θανάτωσης των ζώων ή στο πλαίσιο της διαδικασίας αυτής.

Αιματολογικές εξετάσεις που περιλαμβάνουν τουλάχιστον μετρήσεις αιματοκρίτη, συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, αιμοπεταλίων καθώς και μετρήσεις της πηκτικότητας του αίματος όπως είναι ο χρόνος πήξης, ο χρόνος προθρομβίνης ή θρομβοπλαστίνης πρέπει να εκτελούνται στην αρχή της μελέτης, κατόπιν ανά μήνα ή στο μέσο της μελέτης και τέλος όταν η μελέτη ολοκληρωθεί.

Εκτελούνται κλινικοί βιοχημικοί προσδιορισμοί για τη διερεύνηση κύριων τοξικών επιπτώσεων στους ιστούς και, ειδικότερα, στο νεφρό και στο ήπαρ στα δείγματα αίματος που λαμβάνονται από κάθε ζώο στην αρχή της μελέτης, κατόπιν ανά μήνα ή στο μέσο της μελέτης και τέλος όταν λήξει το χρονικό διάστημα της μελέτης. Εξετάζονται τα εξής: ηλεκτρολυτική ισορροπία, μεταβολισμός υδρογονανθράκων και νεφρική και ηπατική λειτουργία. Η επιλογή των συγκεκριμένων δοκιμασιών εξαρτάται από τις παρατηρήσεις για τον τρόπο δράσης της υπό δοκιμή ουσίας. Πριν την αιμοληψία, τα ζώα υποβάλλονται σε νηστεία για διάστημα ανάλογο με το είδος. Προτείνεται να προσδιορίζονται: ασβέστιο, φώσφορος, χλώριο, νάτριο, κάλιο, γλυκόζη μετά από νηστεία, αμινοτρανσφεράση της αλα-νίνης, αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος δεκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση, άζωτο ουρίας, αλβουμίνη, κρεατινίνη αίματος, ολική χολερυθρίνη και ολικές πρωτεΐνες ορού.

Αναλύσεις ούρων εκτελούνται τουλάχιστον στην αρχή, στο μέσο και στο τέλος της μελέτης με δείγματα ούρων τα οποία συλλέγονται σε προκαθορισμένο χρόνο: Με τις αναλύσεις ούρων προσδιορίζονται τα εξής: εμφάνιση, όγκος, οσμωτική ικανότητα ή ειδικό βάρος, pH, πρωτεΐνη, γλυκόζη και αίμα/αιμοκύτταρα. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν και πρόσθετες παράμετροι όπου απαιτείται για την επέκταση της έρευνας των επιπτώσεων που παρατηρήθηκαν.

Επιπλέον, εξετάζεται η σκοπιμότητα να μελετηθούν οι ορολογικοί δείκτες για τις γενικής φύσεως βλάβες που έχουν υποστεί οι ιστοί. Άλλοι προσδιορισμοί, οι οποίοι μπορεί να είναι αναγκαίοι για την τοξικολογική αξιολόγηση, περιλαμβάνουν: ανάλυση λιπιδίων, ορμονών, ισορροπία οξέων/βάσεων, μεθαιμοσφαιρίνης και αναστολής χολινεστεράσης. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κλινικοί βιοχημικοί προσδιορισμοί για την επέκταση της έρευνας των παρατηρηθεισών επιπτώσεων. Αυτοί οι προσδιορισμοί εκτελούνται για χημικές ουσίες ορισμένων κατηγοριών ή κατά περίπτωση.

Γενικά, απαιτείται ευέλικτη προσέγγιση, εξαρτώμενη από τα είδη και την παρατηρούμενη ή/και αναμενόμενη επίπτωση μιας δεδομένης ουσίας.

1.5.5.3. *Μακροσκοπική νεκροψία*

Όλα τα ζώα της μελέτης υποβάλλονται σε πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των φυσικών στομίων του σώματος καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Το ήπαρ με τη χοληδόχο κύστη, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, οι όρχεις, οι επιδιδυμίδες, οι ωοθήκες, η μήτρα, ο θυροειδής (με τους παραθυροειδείς), ο θύμος, η σπλήνα, ο εγκέφαλος και η καρδιά όλων των ζώων (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα ή/και όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει) καθαρίζονται από τυχόν άλλους προσκολλημένους ιστούς, όπως ενδείκνυται, και ζυγίζονται υγρά αμέσως μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση.

▼B

Οι ακόλουθοι ιστοί διατηρούνται σε στερεωτικό μέσο κατάλληλο και για τον τύπο ιστού και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης στο οποίο ενδεχομένως υποβληθεί ο εν λόγω ιστός στο μέλλον: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο εγκέφαλος (αντιπροσωπευτικές περιοχές στις οποίες περιλαμβάνονται το άνω τμήμα του εγκεφάλου, η παρεγκεφαλίδα και ο μυελός/γέφυρα), ο νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός), η υπόφυση, τα μάτια, ο θυρεοειδής, ο παραθυρεοειδής, ο θύμος, ο οισοφάγος, οι σιελογόνοι αδένες, ο στόμαχος, το λεπτό και το παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων των κηλίδων του Peyer), το ήπαρ, η χοληδόχος κύστη, το πάγκρεας, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, η σπλήνα, η καρδιά, η τραχεία και οι πνεύμονες, η αορτή, οι γονάδες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, ο θηλαστικός αδένας θήλεος. ο προστάτης, η ουροδόχος κύστη, η χοληδόχος κύστη, οι λεμφαδένες (κατά προτίμηση ένας λεμφαδένας που καλύπτει την οδό χορήγησης και ένας άλλος, απομακρυσμένος ως προς την οδό χορήγησης, ο οποίος καλύπτει τις επιπτώσεις στο σωματικό σύστημα), το περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο) κατά προτίμηση κοντά στον μυ, τμήμα του μυελού οστού (ή/και νωπός μυελός οστού λαμβανόμενος με αναρρόφηση) και το δέρμα. Κλινικά και άλλα ευρήματα ενδεχομένως υποδεικνύουν ότι θα πρέπει να εξεταστούν και άλλοι πρόσθετοι ιστοί.

Διατηρούνται επίσης και όλα τα όργανα τα οποία, με βάση τις ήδη γνωστές ιδιότητες της δοκιμαζόμενης ουσίας, ενδέχεται να αποτελούν όργανα στόχους.

1.5.5.4. *Ιστοπαθολογία*

Διεξάγεται πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση στα όργανα και στους ιστούς (που έχουν διατηρηθεί) όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες των μαρτύρων και στις ομάδες υψηλής δόσης. Οι εξετάσεις επεκτείνονται στα ζώα των ομάδων άλλων δόσεων εάν στην ομάδα υψηλής δόσης έχουν παρατηρηθεί αλλαγές σχετιζόμενες με την αγωγή.

Εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές βλάβες.

Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, εκτελείται ιστοπαθολογική εξέταση στους ιστούς και στα όργανα τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν επιπτώσεις στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

2.1. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Για κάθε ζώο παρέχονται αναλυτικά στοιχεία. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφαίνονται, για κάθε ομάδα δοκιμής ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο αριθμός των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ή θανατώθηκαν για ανθρωπιστικούς λόγους και ο χρόνος θανάτου ή θανάτωσης, ο αριθμός αυτών που εμφάνισαν τοξικότητα, περιγραφή των συμπτωμάτων τοξικότητας (χρόνος εμφάνισης, διάρκεια και σοβαρότητα των τοξικών επιπτώσεων, αριθμός των ζώων που εμφανίζουν βλάβες, τι είδους βλάβες και ποσοστό ζώων που εμφανίζουν κάθε είδους βλάβη).

Τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με κατάλληλη και γενικώς αποδεκτή στατιστική μέθοδο. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα επιλέγονται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

2.2. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

▼B

2.2.1. **Υπό δοκιμή ουσία:**

— φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά,

— αναγνωριστικά στοιχεία,

— έκδοχο (όπου απαιτείται): αιτιολόγηση της επιλογής του εκδόχου, όταν δεν είναι το νερό.

2.2.2. **Είδος πειραματόζωου:**

— χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων,

— πηγή προέλευσης, συνθήκες στέγασης, δίαιτα, κ.λπ.

— βάρος κάθε ζώου στην αρχή της δοκιμασίας.

2.2.3. **Συνθήκες δοκιμής:**

— σκεπτικό επιλογής των δόσεων.

— λεπτομέρειες σχηματισμού της υπό δοκιμή ουσίας/της προετοιμασίας της τροφής, επιτευχθείσα συγκέντρωση, σταθερότητα και ομογένεια του παρασκευάσματος,

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,

— ακριβείς δόσεις (mg/km βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή ή στο πόσιμο νερό στην πραγματικά λαμβανόμενη δόση, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού.

2.2.4. **Αποτελέσματα:**

— βάρος σώματος και αλλαγές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής και κατανάλωση ύδατος, κατά περίπτωση,

— δεδομένα τοξικών αποκρίσεων ανά δόση και φύλο, συμπεριλαμβανόμενων ενδείξεων τοξικότητας,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (είτε είναι αναστρέψιμες είτε όχι),

— οφθαλμολογική εξέταση,

— αιματολογικές δοκιμασίες με σχετικές τιμές αναφοράς,

— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις με σχετικές τιμές αναφοράς,

— τελικό βάρος σώματος, βάρος οργάνων και λόγος βάρους οργάνων/βάρος σώματος,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερής περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στοιχεία απορρόφησης εάν είναι διαθέσιμα,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό.

Σχολιασμός των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

▼B

B.28 **ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η δοκιμαζόμενη ουσία τίθεται καθημερινά πάνω στο δέρμα σε προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων, μία δόση ανά ομάδα για περίοδο 90 ημερών. Κατά την περίοδο της αγωγής τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς επίσης και τα επιζήσαντα ζώα στο τέλος του πειράματος, υφίστανται νεκροψία.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Προπαρασκευή

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Λίγο πριν από τη δοκιμασία το τρίχωμα απομακρύνεται με κούρεμα από τη νωτιαία περιοχή του κορμού των πειραματόζωων. Μπορεί επίσης να απομακρυνθεί με ξύρισμα, που πρέπει όμως να γίνει 24 ώρες περίπου πριν από τη δοκιμασία. Επανάληψη του κουρέματος ή ξυρίσματος απαιτείται συνήθως κάθε εβδομάδα περίπου. Κατά το κούρεμα ή το ξύρισμα του τριχώματος πρέπει να καταβληθεί προσοχή ώστε να αποφευχθεί ή εκδορά του δέρματος. Δέκα τοις εκατό τουλάχιστον της επιφάνειας του δέρματος πρέπει να είναι γυμνή για την επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Το βάρος του ζώου πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη λήψη της απόφασης σχετικά με την περιοχή που θα πρέπει να απογυμνωθεί και για τις διαστάσεις της επικάλυψης. Κατά τη δοκιμασία στερεών ουσιών, που μπορούν, εφόσον είναι δυνατό, να κονιοποιηθούν, η δοκιμαζόμενη ουσία πρέπει να υγρανθεί επαρκώς με νερό ή, εφόσον χρειάζεται, με κατάλληλο έκδοχο για να εξασφαλισθεί καλή επαφή με το δέρμα. Οι υγρές δοκιμαζόμενες ουσίες χρησιμοποιούνται συνήθως χωρίς αραίωση. Εφαρμόζεται καθημερινή επίθεση της ουσίας επί πέντε ή επτά ημέρες την εβδομάδα.

Συνθήκες δοκιμασίας

Π ε ι ρ α μ α τ ό ζ ω α

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο αρουραίος, το κουνέλι ή το ινδικό χοιρίδιο, πλήρους ανάπτυξης. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, αλλά η χρήση τους θα απαιτούσε αιτιολόγηση. Στην αρχή του πειράματος, η διαφορά βάρους δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους. Στην περίπτωση που διεξάγεται υποχρόνια μελέτη δερματικής τοξικότητας, για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική για μια μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και στις δύο μελέτες τα ίδια είδη και στελέχη.

▼B

Αριθμός και φύλο

Τουλάχιστον 20 ζώα (10 θηλυκά και 10 αρσενικά) με υγιές δέρμα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε κάθε επίπεδο δόσης. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν σχεδιάζονται ενδιάμεσες θανατώσεις, ο αριθμός θα πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Εκτός αυτού, μία δορυφορική ομάδα 20 ζώων (10 ζώα ανά φύλο) μπορεί να υποβληθεί σε αγωγή με το υψηλό επίπεδο δόσης επί 90 ημέρες και να παρατηρείται για αναστρεψιμότητα, εμμονή ή καθυστερημένη εμφάνιση των τοξικών επιδράσεων για μεταγενέστερη αγωγή 28 ημερών.

Επίπεδα δόσεων

Απαιτούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και ένας μάρτυρας ή έκδοχο μάρτυρας εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο. Η περίοδος έκθεσης θα πρέπει να ανέρχεται σε έξι ώρες τουλάχιστον την ημέρα. Η επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας πρέπει να γίνεται σε παραπλήσιες χρονικές στιγμές κάθε ημέρα, και η ποσότητα της επιτιθέμενης ουσίας να προσαρμόζεται κατά διαστήματα (κάθε μία ή δύο εβδομάδες) για τη διατήρηση ενός σταθερού επιπέδου δόσης, με βάση το βάρος του σώματος του ζώου. Εκτός από την αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία τα ζώα στην ομάδα μάρτυρα πρέπει κατά τα άλλα να έχουν την ίδια μεταχείριση με εκείνα της ομάδας. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο για να διευκολύνει τη χορήγηση των δόσεων, τα ζώα της ομάδας ελέγχου εκδόχου λαμβάνουν δόσεις κατά τον ίδιο τρόπο όπως οι ομάδες που υφίστανται την αγωγή και λαμβάνουν την ίδια ποσότητα $μ^2$ εκείνη που λαμβάνεται από την ομάδα υψηλότερου επιπέδου δόσης. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να προκαλέσει τοξικές επιδράσεις όχι όμως και θανάτους ή τουλάχιστον πολύ λίγους. Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν πρέπει να προκαλεί οποιοδήποτε ίχνος τοξικότητας. Στην περίπτωση που υπάρχει χρησιμοποιήσιμη εκτίμηση ανθρώπινης έκθεσης, το χαμηλότερο επίπεδο θα πρέπει να την υπερβεί. Στην ιδανική περίπτωση το ενδιάμεσο επίπεδο δόσης πρέπει να προκαλεί ελάχιστες παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις. Εάν χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία ενδιάμεσες δόσεις, τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να απέχουν μεταξύ τους έτσι ώστε να προκαλούν μια κλιμάκωση τοξικών επιδράσεων.

Στη χαμηλή και στην ενδιάμεση ομάδα, καθώς και στην ομάδα μάρτυρα, η επέλευση οποιωνδήποτε θανάτων πρέπει να είναι χαμηλή έτσι ώστε να επιτρέπει μια ουσιαστική εκτίμηση αποτελεσμάτων.

Εάν η επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας δημιουργήσει σοβαρό ερεθισμό του δέρματος, οι συγκεντρώσεις πρέπει να ελαττωθούν, και αυτό ίσως να έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση ή την απουσία άλλων τοξικών επιδράσεων στο υψηλό επίπεδο δόσης. Εάν το δέρμα έχει υποστεί σοβαρή βλάβη, πιθανόν να χρειαστεί να τερματιστεί η μελέτη και να επαναληφθεί με χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Οριακή δοκιμασία

Εάν μια προκαταρκτική μελέτη σε επίπεδο δόσης 1 000 mg/kg ή σε υψηλότερα επίπεδο δόσης αναφορικά με ενδεχόμενη ανθρώπινη έκθεση, όπου αυτό είναι γνωστό, δεν προκαλεί τοξικές επιδράσεις, η συνέχιση του πειράματος μπορεί να μη θεωρηθεί αναγκαία.

Περίοδος παρατήρησης

Τα πειραματόζωα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά για ενδείξεις τοξικότητας. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των σημείων τοξικότητας.

▼B

Διαδικασία

Τα ζώα πρέπει να παραμένουν σε χωριστά κλουβιά και το ιδανικό είναι να υποβάλλονται σε αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία επτά ημέρες την εβδομάδα για περίοδο 90 ημερών. Τα ζώα σε οποιαδήποτε δορυφορική ομάδα, που έχει προγραμματισθεί για παραπέρα παρατηρήσεις, πρέπει να διατηρούνται για 28 ημέρες ακόμα χωρίς αγωγή για τη διάγνωση της θεραπείας ή της εμμονής των τοξικών επιδράσεων. Ο χρόνος έκθεσης πρέπει να ανέρχεται σε έξι ώρες την ημέρα.

Η δοκιμαζόμενη ουσία πρέπει να επιτίθεται ομοιόμορφα σε έκταση ίση με το 10 % περίπου της συνολικής επιφάνειας του σώματος. Στην περίπτωση ουσιών υψηλής τοξικότητας, η καλυπτόμενη επιφάνεια μπορεί να είναι μικρότερη, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε όσο το δυνατόν περισσότερη επιφάνεια να καλύπτεται με όσο το δυνατόν λεπτό και ομοιόμορφο στρώμα.

Κατά τη διάρκεια της έκθεσης η δοκιμαζόμενη ουσία διατηρείται σε επαφή με το δέρμα με τη χρήση πορώδους επίδεσμου και λευκοπλάστη που δεν προκαλεί ερεθισμό. Η περιοχή της έκθεσης πρέπει να καλύπτεται ακόμη με κατάλληλο τρόπο για τη συγκράτηση του επιδέσμου και της δοκιμαζόμενης ουσίας και για την εξασφάλιση της μη κατάποσης της δοκιμαζόμενης ουσίας από τα ζώα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα συγκράτησης για την πρόληψη της κατάποσης της δοκιμαζόμενης ουσίας, αλλά δεν συνιστάται η πλήρης ακινητοποίηση. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης τα κατάλοιπα της δοκιμαζόμενης ουσίας θα πρέπει να απομακρυνθούν, εφόσον είναι δυνατό με τη χρήση νερού ή κάποιας άλλης κατάλληλης μεθόδου καθαρισμού του δέρματος. Όλα τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και να καταγράφονται οι ενδείξεις τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειας τους.

Οι παρατηρήσεις «κλωβού» πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς. Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις νια την κατανάλωση τροφής, καθώς και ζύγιση των ζώων κάθε εβδομάδα.

Η τακτική παρατήρηση των ζώων είναι αναγκαία για την το κατά μέγιστο δυνατόν εξασφάλιση της μη απωλείας ζώων από τη δοκιμασία, οφειλομένη σε αιτίες όπως είναι ο κανιβαλισμός, η αυτόλυση των ιστών ή η εσφαλμένη τοποθέτηση. Στο τέλος της περιόδου της μελέτης όλα τα επιζώντα ζώα στις μη δορυφορικές ομάδες αγωγής υφίστανται νεκροψία. Όταν παρατηρούνται ετοιμοθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Οι παρακάτω εξετάσεις γίνονται συνήθως σε όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων:

α) οφθαλμολογική εξέταση, με τη χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται πριν από την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία και κατά το τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες μάρτυρες. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, πρέπει να εξετασθούν όλα τα ζώα·

β) αιματολογική εξέταση, που περιλαμβάνει εξέταση του αιματοκρίτη, της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, του ερυθροκυτταρικού τύπου, του συνολικού και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, καθώς επίσης και μέτρηση της πηκτικής ικανότητας, όπως είναι ο χρόνος πήξης, ο χρόνος προθρομβίνης, ο χρόνος θρομβοπλαστίνης ή ο αριθμός των αιματοπεταλίων, πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας·

▼B

γ) κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός του αίματος πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας. Οι περιοχές της δοκιμασίας που θεωρούνται κατάλληλες για όλες τις μελέτες είναι η ηλεκτρολυτική ισορροπία ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και η λειτουργία του ήπατος και νεφρού. Η επιλογή ιδιαίτερων πειραμάτων θα επηρεασθεί από τις παρατηρήσεις για τον τρόπο επενέργειας της ουσίας. Προτείνονται προσδιορισμοί του ασβεστίου, του φωσφόρου, των χλωριούχων, του νατρίου, του καλίου, της γλυκόζης νηστείας (με περίοδο νηστείας ανάλογα με το είδος του ζώου), της τρανσαμινάσης του γλουταμιντκού και πυροαταφυλικού οξέος του ορού, της τρανσαμινάπης του γλουταμινικού ([1]) και οξαλοξεικού οξέος του ορού ([2]), της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης, της γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάσης, του αζώτου ουρίας, του λευκώματος, της κρεατινίνης του αίματος, της συνολικής χολερυθρίνης και της συνολικής πρωτεΐνης του ορού. Άλλοι προσδιορισμοί που μπορεί να είναι αναγκαίοι για μία επαρκή τοξικολογική εκτίμηση περιλαμβάνουν αναλύσεις των λιπιδίων, των ορμονών, της ισορροπίας οξέος/βάσης, της μεθαιμοσφαιρίνης και της δραστικότητας της χολινεστεράσης. Πρόσθετη κλινική βιοχημική εξέταση μπορεί να διενεργηθεί, όπου είναι αναγκαίο, για την επέκταση της έρευνας των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων

(δ) η ανάλυση των ούρων δεν απαιτείται επί τακτικής βάσεως αλλά μόνον όταν υπάρξει ένδειξη που θα βασίζεται σε αναμενόμενη ή παρατηρούμενη τοξικότητα.

Εάν τα βασικά ιστορικά στοιχεία είναι ανεπαρκή, πρέπει να εξετασθεί αν χρειάζεται ο προσδιορισμός των αιματολογικών και κλινικών βιοχημικών παραμέτρων πριν την έναρξη της χορήγησης των δόσεων.

Μακροσκοπική νεκροψία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που περιλαμβάνει εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγισθούν υγρά το συντομότερο δυνατόν μετά την ανατομή έτσι ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση. Τα παρακάτω όργανα και ιστοί θα πρέπει να διατηρηθούν σε κατάλληλο μέσο για ενδεχόμενη μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο εγκέφαλος — συμπεριλαμβανομένων τμημάτων μυελού/γέφυρας του εγκεφάλου, παρεγκεφαλικού και εγκεφαλικού φλοιού —, η υπόφυση, ο θυρεοειδής/παραθυρεοειδής, όλοι οι θυμικοί ιστοί (η τραχεία), οι πνεύμονες, η καρδιά, η αορτή, οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ, η σπλήνα, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, η χοληδόχος κύστη (εάν υπάρχει), ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η ουροδόχος κύστη, ο αντιπροσωπευτικός λεμφαδένας (ο μαστικός αδένας θήλεος), (το μυϊκό σύστημα μηρών), το περιφερικό νεύρο (οι οφθαλμοί), (το στέρνο με μυελό των οστών), (το μηριαίον οστούν, συμπεριλαμβανομένης της αρθρικής επιφάνειας), (ο νωτιαίος μυελός σε τρία επίπεδα —αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός), και (οι εξώφθαλμοι δακρυϊκοί αδένες). Οι ιστοί που αναφέρονται μεταξύ παρενθέσεων χρειάζονται εξέταση μόνον εάν υπάρχουν ενδείξεις τοξικότητας ή επιπλοκής οργάνων που αποτελούν αντικείμενο μελέτης.

Ιστοπαθολογική εξέταση

α) Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί στο μη θιγέν δέρμα και στο δέρμα που υπέστη αγωγή, καθώς επίσης και στα όργανα και στους ιστούς όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες μάρτυρα και υψηλής δόσης.

β) Όλες οι μακροσκοπικές βλάβες πρέπει να εξετασθούν.

([1]) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση της αλανίνης του ορού.
([2]) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανοφεράση του ασπαρτικού οξέος του ορού.

▼B

γ) Τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης σε άλλες ομάδες δόσης πρέπει να εξετασθούν.

δ) Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται αρουραίοι, οι πνεύμονες των ζώων στις ομάδες χαμηλής και ενδιάμεσης δόσης πρέπει να υποστούν ιστοπαθολογική εξέταση για τη διαπίστωση λοίμωξης, γιατί έτσι επιτυγχάνεται μια εύκολη εκτίμηση της κατάστασης της υγείας των ζώων. Μπορεί να μην απαιτείται τακτικά πρόσθετη ιστοπαθολογική εξέταση των ζώων των ομάδων αυτών, αλλά θα πρέπει πάντοτε να διενεργείται σε όργανα τα οποία παρουσίασαν ίχνη βλάβης στην ομάδα υψηλής δόσης.

ε) Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, η ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διενεργείται σε ιστούς και όργανα τα οποία έχει εξακριβωθεί ότι παρουσιάζουν επιδράσεις στις άλλες ομάδες που υφίστανται την αγωγή.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που θα παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν βλάβες τον τύπο των βλαβών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο βλάβης. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να εκτιμώνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση της δοκιμασίας δα πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, δίαιτα κλπ.,

— συνθήκες δοκιμασίας,

— επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, αν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,

— στοιχεία τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση,

— επίπεδο στο οποίο η ουσία δεν παρουσίασε επιδράσεις, εφόσον είναι δυνατόν,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,

— περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,

— χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,

— στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,

— οφθαλμολογικά ευρήματα,

— αιματολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους,

— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και αποτελέσματα (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων τυχόν ανάλυσης ούρων),

— ευρήματα νεκροψίας,

▼B

— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι δυνατόν,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼M4

Β.29. ΥΠΟΧΡΟΝΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ

ΣΥΝΟΨΗ

Η παρούσα αναθεωρημένη έκθεση δοκιμής Β.29 έχει σχεδιαστεί για τον πλήρη χαρακτηρισμό της τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, η οποία χορηγείται μέσω της αναπνευστικής οδού για μια υποχρόνια περίοδο (90 ημέρες), και για την παροχή αξιόπιστων δεδομένων με στόχο την ποσοτική εκτίμηση των αναπνευστικών κινδύνων. Ομάδες 10 αρσενικών και 10 θηλυκών τρωκτικών εκτίθενται για 6 ώρες την ημέρα για 90 ημέρες (13 εβδομάδες) α) στην ελεγχόμενη χημική ουσία σε τρία ή περισσότερα επίπεδα συγκέντρωσης, β) σε φιλτραρισμένο αέρα (αρνητικός μάρτυρας) και/ή γ) στον φορέα (μάρτυρας για τον φορέα). Τα ζώα εκτίθενται γενικά 5 ημέρες την εβδομάδα αλλά επιτρέπεται επίσης έκθεση 7 ημέρες την εβδομάδα. Ελέγχονται πάντα θηλυκά και αρσενικά ζώα, αλλά ενδέχεται να εκτίθενται σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης εάν είναι γνωστό ότι ένα φύλο είναι πιο ευαίσθητο σε μια δεδομένη ελεγχόμενη χημική ουσία. Με τη μέθοδο αυτή ο διευθυντής της μελέτης έχει την ευελιξία να συμπεριλάβει στη μελέτη δορυφορικές ομάδες (αναστρεψιμότητας), ενδιάμεσες θανατώσεις, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), νευρολογικές δοκιμές και πρόσθετες εκτιμήσεις κλινικής παθολογίας και ιστοπαθολογίας ώστε να χαρακτηριστεί καλύτερα η τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 413 του ΟΟΣΑ (2009). Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 413 (TG 413) για την υποχρόνια αναπνευστική τοξικότητα εκδόθηκε το 1981 (1). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.29 [όντας ισοδύναμη της αναθεωρημένης TG 413 (2009)] έχει επικαιροποιηθεί ώστε να αντανακλά την πρόοδο της επιστήμης και να ανταποκρίνεται στις τρέχουσες και τις μελλοντικές κανονιστικές ανάγκες.

2. Οι μελέτες υποχρόνιας αναπνευστικής τοξικότητας χρησιμοποιούνται κυρίως για την εξαγωγή κανονιστικών επιπέδων συγκέντρωσης για την εκτίμηση των κινδύνων για τους εργαζόμενους σε χώρους εργασίας. Χρησιμοποιούνται επίσης για την εκτίμηση των κινδύνων για τις κατοικίες, τις μεταφορές και το περιβάλλον. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον χαρακτηρισμό των δυσμενών επιδράσεων που προκαλούνται από επανειλημμένη καθημερινή αναπνευστική έκθεση σε μια ελεγχόμενη χημική ουσία για 90 ημέρες (περίοδος ίση με το 10 % περίπου της διάρκειας ζωής ενός επίμυ). Τα δεδομένα που προέρχονται από μελέτες υποχρόνιας αναπνευστικής τοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτική εκτίμηση των κινδύνων και την επιλογή συγκεντρώσεων για χρόνιες μελέτες. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν έχει σχεδιαστεί ειδικά για τον έλεγχο νανοϋλικών. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο καθοδήγησης GD 39 (2).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

3. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη από το πειραματικό εργαστήριο όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης ώστε να βελτιώνεται η ποιότητα της μελέτης και να ελαχιστοποιείται η χρήση των ζώων. Πληροφορίες που θα βοηθήσουν στην επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας· τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας in vitro ή in vivo· οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου· τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR και τα τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς ουσίες· και τα δεδομένα που προέρχονται από άλλες μελέτες επανειλημμένης έκθεσης. Εάν αναμένεται να προκληθεί ή παρατηρείται κατά τη διάρκεια της μελέτης νευροτοξικότητα, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να συμπεριλάβει κατάλληλες αξιολογήσεις, όπως σειρά δοκιμασιών παρατήρησης λειτουργικών διαταραχών (functional observational battery — FOB) και μέτρηση της κινητικής δραστηριότητας. Αν και το χρονοδιάγραμμα των εκθέσεων που σχετίζονται με ειδικές εξετάσεις ενδέχεται να είναι πολύ σημαντικό, η εκτέλεση αυτών των πρόσθετων δραστηριοτήτων δεν θα πρέπει να παρεμβάλλεται στον σχεδιασμό της κυρίως μελέτης.

▼M4

4. Διαλύματα διαβρωτικών ή ερεθιστικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών μπορούν να ελέγχονται σε συγκεντρώσεις που θα αποδώσουν τον επιθυμητό βαθμό τοξικότητας. Περισσότερες πληροφορίες παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (2). Κατά την έκθεση ζώων σε αυτά τα υλικά, οι επιδιωκόμενες συγκεντρώσεις θα πρέπει να τόσο χαμηλές ώστε να μην προκαλούν έντονο πόνο και δυσφορία, αλλά να επιτρέπουν την επέκταση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης σε επίπεδα που επιτυγχάνουν τους κανονιστικούς και επιστημονικούς στόχους της δοκιμής. Οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να επιλέγονται κατά περίπτωση, κατά προτίμηση βάσει μιας καταλλήλως σχεδιασμένης μελέτης καθορισμού εύρους που επιτρέπει τη λήψη πληροφοριών σχετικά με το κρίσιμο καταληκτικό σημείο, τυχόν όριο ερεθισμού και τον χρόνο εμφάνισης των εκδηλώσεων (βλέπε παραγράφους 11-13). Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή των συγκεντρώσεων.

5. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν έντονο πόνο ή έντονη και διαρκή δυσφορία, πρέπει να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο. Τα ετοιμοθάνατα ζώα αντιμετωπίζονται όπως τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη δοκιμή. Τα κριτήρια για τη λήψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και οι κατευθύνσεις για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικείμενου θανάτου, αποτελούν το αντικείμενο εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (3).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

6. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα τρωκτικά των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Το προτιμώμενο είδος είναι ο επίμυς. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση.

Προετοιμασία των ζώων

7. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Κατά την ημέρα τυχαιοποίησης, τα ζώα πρέπει να είναι νεαρά ενήλικα ζώα ηλικίας 7 έως 9 εβδομάδων. Το βάρος του σώματός τους πρέπει να είναι ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαδεύονται για να μπορούν να αναγνωριστούν και στεγάζονται σε κλωβούς επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου.

Ζωοτεχνία

8. Κάθε ζώο πρέπει να ταυτοποιείται, κατά προτίμηση με υποδόριο αναμεταδότη, ώστε να διευκολύνεται η παρατήρηση και να αποφεύγεται η σύγχυση. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται, σε ιδανικές συνθήκες, εντός ενός εύρους 30 έως 70 %, αν και αυτό ενδέχεται να μην είναι δυνατό όταν χρησιμοποιείται το νερό ως φορέας. Πριν και μετά την έκθεση, τα ζώα πρέπει γενικά να στεγάζονται σε κλωβούς σε ομάδες ανά φύλο και συγκέντρωση, αλλά ο αριθμός των ζώων ανά κλωβό δεν πρέπει να εμποδίζει την παρατήρηση κάθε ζώου, ενώ θα πρέπει να ελαχιστοποιεί τυχόν απώλειες λόγω κανιβαλισμού ή μαχών. Όταν τα ζώα πρόκειται να εκτεθούν μόνο ρινικά, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να εγκλιματίζονται στους σωλήνες συγκράτησης. Οι σωλήνες συγκράτησης δεν θα πρέπει να προκαλούν περιττή φυσική, θερμική δυσφορία ή δυσφορία λόγω ακινητοποίησης στα ζώα. Η συγκράτηση ενδέχεται να επηρεάζει τα φυσικά καταληκτικά σημεία, όπως τη θερμοκρασία του σώματος (υπερθερμία) και/ή τον όγκο του αναπνεόμενου αέρα ανά λεπτό. Εάν υπάρχουν διαθέσιμα γενικά δεδομένα που δείχνουν ότι δεν προκαλούνται τέτοιες αλλαγές σε σημαντικό βαθμό, τότε δεν είναι απαραίτητη η προκαταρκτική προσαρμογή στους σωλήνες συγκράτησης. Τα ζώα που εκτίθενται ολόσωμα σε αερόλυμα θα πρέπει να στεγάζονται απομονωμένα κατά τη διάρκεια της έκθεσης, ώστε να αποφεύγεται η διήθηση του ελεγχόμενου αερολύματος μέσω του τριχώματος των ζώων που στεγάζονται στον ίδιο κλωβό. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά και πιστοποιημένα εργαστηριακά σιτηρέσια, εκτός από την περίοδο έκθεσης, συνοδευόμενα από απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού από το δίκτυο ύδρευσης. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών.

▼M4

Θάλαμοι εισπνοής

9. Κατά την επιλογή θαλάμου εισπνοής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η φύση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και ο στόχος της δοκιμής. Προτιμώμενος τρόπος έκθεσης είναι η ρινική έκθεση (ο εν λόγω όρος περιλαμβάνει κεφαλική, ρινική ή ρυγχική έκθεση). Η ρινική έκθεση προτιμάται γενικά για μελέτες με υγρά ή στερεά αερολύματα και για ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνώνονται σε αερολύματα. Ειδικοί στόχοι της μελέτης ενδέχεται να επιτυγχάνονται καλύτερα με την εφαρμογή μεθόδου ολόσωμης έκθεσης, αλλά αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται στην έκθεση της μελέτης. Για να εξασφαλίζεται η σταθερότητα της ατμόσφαιρας κατά τη χρήση θαλάμου ολόσωμης έκθεσης, ο συνολικός όγκος των ελεγχόμενων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του θαλάμου. Οι αρχές των τεχνικών ρινικής και ολόσωμης έκθεσης, καθώς και τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους, αναφέρονται στο έγγραφο GD 39 (2).

ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οριακές συγκεντρώσεις

10. Σε αντίθεση με τις μελέτες οξείας τοξικότητας, δεν υπάρχουν καθορισμένες οριακές συγκεντρώσεις στις μελέτες υποχρόνιας αναπνευστικής τοξικότητας. Η μέγιστη ελεγχόμενη συγκέντρωση θα πρέπει να εξαρτάται από: 1) τη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση, 2) το επίπεδο έκθεσης του ανθρώπου βάσει του «χείριστου σεναρίου», 3) την ανάγκη διατήρησης επαρκούς παροχής οξυγόνου και/ή 4) ζητήματα καλής μεταχείρισης των ζώων. Εάν δεν υπάρχουν όρια βάσει στοιχείων, μπορούν να χρησιμοποιούνται τα όρια οξείας τοξικότητας του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (13) (ήτοι, μέγιστη συγκέντρωση 5 mg/l για αερολύματα, 20 mg/l για ατμούς και 20 000 ppm για αέρια)· βλέπε έγγραφο GD 39 (2). Τυχόν υπέρβαση των ορίων αυτών κατά τον έλεγχο αερίων ή ιδιαιτέρως πτητικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών (π.χ. ψυκτικών μέσων) θα πρέπει να αιτιολογείται. Η οριακή συγκέντρωση θα πρέπει να προκαλεί σαφή τοξικότητα χωρίς να προκαλείται περιττό άγχος στα ζώα και χωρίς να επηρεάζεται η μακροζωία τους (3).

Μελέτη καθορισμού εύρους

11. Πριν από την έναρξη της κυρίως μελέτης, είναι γενικά απαραίτητη η διεξαγωγή μελέτης καθορισμού εύρους. Η μελέτη καθορισμού εύρους είναι πιο ολοκληρωμένη από την αναγνωριστική μελέτη διότι δεν περιορίζεται στην επιλογή συγκεντρώσεων. Οι γνώσεις που αποκτώνται από τη μελέτη καθορισμού εύρους μπορούν να οδηγήσουν στην επιτυχία της κυρίως μελέτης. Μια μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί, παραδείγματος χάριν, να παρέχει τεχνικές πληροφορίες σχετικά με αναλυτικές μεθόδους, την κατανομή μεγέθους σωματιδίων, την ανακάλυψη τοξικών μηχανισμών, δεδομένα κλινικής παθολογίας και ιστοπαθολογίας, και εκτιμήσεις των συγκεντρώσεων NOAEL και MTC σε μια κυρίως μελέτη. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει τη μελέτη καθορισμού εύρους για να εντοπίσει το όριο ερεθισμού της αναπνευστικής οδού (π.χ. μέσω της ιστοπαθολογίας της αναπνευστικής οδού, δοκιμής της λειτουργίας των πνευμόνων ή βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος), την ανώτερη συγκέντρωση που είναι ανεκτή χωρίς να προκαλείται περιττό άγχος στα ζώα και τις παραμέτρους που χαρακτηρίζουν με τον καλύτερο τρόπο την τοξικότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

12. Η μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί να περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα επίπεδα συγκέντρωσης. Ανάλογα με τα επιλεγμένα καταληκτικά σημεία, θα πρέπει να εκτίθενται σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης τρία έως έξι αρσενικά και τρία έως έξι θηλυκά ζώα. Η μελέτη καθορισμού εύρους θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 5 μέρες και γενικά να μην υπερβαίνει τις 28 ημέρες. Στην έκθεση της μελέτης θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή συγκεντρώσεων για την κυρίως μελέτη. Στόχος της κυρίως μελέτης είναι να καταδειχθεί η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης βάσει των προσδοκιών σχετικά με το πλέον ευαίσθητο καταληκτικό σημείο. Η χαμηλή συγκέντρωση θα πρέπει, σε ιδανικές συνθήκες, να είναι η μέγιστη συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις, ενώ η υψηλή συγκέντρωση θα πρέπει να προκαλεί σαφή τοξικότητα χωρίς να προκαλεί περιττό άγχος στα ζώα ή να επηρεάζει τη μακροζωία τους (3).

▼M4

13. Κατά την επιλογή επιπέδων συγκέντρωσης για τη μελέτη καθορισμού εύρους, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων των σχέσεων δομής-δράσης και στοιχείων για παρόμοιες χημικές ουσίες (βλέπε παράγραφο 3). Η μελέτη καθορισμού εύρους μπορεί να επαληθεύει/διαψεύδει τα θεωρούμενα ως πλέον ευαίσθητα, από μηχανιστική πλευρά, καταληκτικά σημεία, π.χ. αναστολή χολινεστεράσης από οργανοφωσφορικές ενώσεις, σχηματισμό μεθαιμοσφαιρίνης από ερυθροκυτταροτοξικούς παράγοντες, θυρεοειδικές ορμόνες (T_3, T_4) για θυρεοτοξικές ουσίες, πρωτεΐνη, LDH ή ουδετερόφυλα σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ή αβλαβή δυσδιάλυτα σωματίδια ή αερολύματα ερεθιστικά για τους πνεύμονες.

Κυρίως μελέτη

14. Η κυρίως μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας γενικά περιλαμβάνει τρία επίπεδα συγκέντρωσης και επίσης παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες (αέρας) και/ή μάρτυρες για τον φορέα κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφο 18). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται όλα τα διαθέσιμα δεδομένα για την επιλογή κατάλληλων επιπέδων έκθεσης, συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων μελετών συστημικής τοξικότητας, του μεταβολισμού και της κινητικής (ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δίνεται στην αποφυγή υψηλών επιπέδων συγκέντρωσης που προκαλούν κορεσμό των κινητικών διεργασιών). Κάθε ομάδα αγωγής περιλαμβάνει 10 αρσενικά και 10 θηλυκά τρωκτικά τα οποία εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία για 6 ώρες καθημερινά, βάσει μιας εβδομάδας 5 ημερών, για μια περίοδο 13 εβδομάδων (η συνολική διάρκεια της μελέτης είναι τουλάχιστον 90 ημέρες). Τα ζώα ενδέχεται επίσης να εκτίθενται 7 ημέρες την εβδομάδα (π.χ. κατά τον έλεγχο εισπνεόμενων φαρμακευτικών ουσιών). Εάν είναι γνωστό ότι ένα φύλο είναι περισσότερο ευαίσθητο σε μια δεδομένη ελεγχόμενη χημική ουσία, τα δύο φύλα ενδέχεται να εκτίθενται σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης ώστε να βελτιστοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 15. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Εάν η διάρκεια έκθεσης είναι μικρότερη των 6 ωρών/ημέρα ή όταν είναι απαραίτητο να διεξαχθεί μελέτη μακράς ολόσωμης έκθεσης (π.χ. 22 ώρες/ημέρα), θα πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση (βλέπε έγγραφο GD 39) (2). Κατά την περίοδο έκθεσης τα ζώα θα πρέπει να στερούνται τροφής, εκτός εάν η έκθεση υπερβαίνει τις 6 ώρες. Νερό μπορεί να παρέχεται καθ' όλη τη διάρκεια της ολόσωμης έκθεσης.

15. Οι επιλεγμένες επιδιωκόμενες συγκεντρώσεις θα πρέπει να προσδιορίζουν το (τα) όργανο(-α)-στόχο και να καταδεικνύουν σαφή σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης:

— Το υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να προκαλεί τοξικές επιδράσεις αλλά όχι παρατεταμένες εκδηλώσεις ή θνησιμότητα που δεν θα επέτρεπαν την ουσιαστική αξιολόγηση.

— Το/-α ενδιάμεσο/-α επίπεδο/-α συγκέντρωσης θα πρέπει να απέχει/-ουν χρονικά έτσι ώστε να επιτρέπεται η διαβάθμιση μεταξύ των τοξικών επιδράσεων που προκαλούνται από τη χαμηλή και την υψηλή συγκέντρωση.

— Το χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να προκαλεί ελάχιστες ή καθόλου ενδείξεις τοξικότητας.

Ενδιάμεσες θανατώσεις

16. Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, τότε ο αριθμός των ζώων σε κάθε επίπεδο έκθεσης πρέπει να αυξηθεί κατά τον αριθμό των ζώων που έχουν προγραμματιστεί να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Η χρήση ενδιάμεσων θανατώσεων θα πρέπει να αιτιολογείται και οι στατιστικές αναλύσεις θα πρέπει να τις αντιπροσωπεύουν σωστά.

▼M4

Δορυφορική μελέτη (αναστρεψιμότητας)

17. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί δορυφορική μελέτη (αναστρεψιμότητας) ώστε να παρατηρηθεί τυχόν αναστρεψιμότητα, παραμονή ή καθυστερημένη εμφάνιση τοξικότητας για μια αρκετά μεγάλη περίοδο μετά την αγωγή, η οποία έχει διάρκεια τουλάχιστον 14 ημέρες. Οι δορυφορικές ομάδες (αναστρεψιμότητας) αποτελούνται από 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα που εκτίθενται παράλληλα με τα πειραματόζωα της κυρίως μελέτης. Οι ομάδες της δορυφορικής μελέτης (αναστρεψιμότητας) θα πρέπει να εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία στο υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης και θα πρέπει να υπάρχουν παράλληλα μάρτυρες για τον αέρα και/ή τον φορέα κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφος 18).

Ζώα-μάρτυρες

18. Τα ζώα που χρησιμοποιούνται ως παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες (αέρας) θα πρέπει να υφίστανται την ίδια μεταχείριση με τα ζώα των ομάδων-αγωγής, με τη μόνη διαφορά ότι τα πρώτα εκτίθενται σε φιλτραρισμένο αέρα και όχι στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Όταν χρησιμοποιείται νερό ή άλλη ουσία για τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας, θα πρέπει να περιλαμβάνεται στη μελέτη ομάδα με μάρτυρες για τον φορέα και όχι ομάδα με αρνητικούς μάρτυρες (αέρας). Το νερό θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως φορέας, όποτε αυτό είναι δυνατό. Όταν χρησιμοποιείται νερό ως φορέας, τα ζώα-μάρτυρες θα πρέπει να εκτίθενται σε αέρα με την ίδια σχετική υγρασία στην οποία εκτίθενται και οι ομάδες έκθεσης. Η επιλογή κατάλληλου φορέα θα πρέπει να βασίζεται σε μια καταλλήλως διεξαχθείσα προκαταρκτική μελέτη ή σε ιστορικά δεδομένα. Εάν δεν είναι ιδιαιτέρως γνωστή η τοξικότητα ενός φορέα, ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να χρησιμοποιήσει και αρνητικούς μάρτυρες (αέρας) και μάρτυρες για τον φορέα, αλλά αυτό δεν συνιστάται. Εάν, βάσει ιστορικών δεδομένων, ένας φορέας δεν είναι τοξικός, τότε δεν απαιτείται να χρησιμοποιηθεί ομάδα αρνητικών μαρτύρων (αέρας) αλλά μόνο ομάδα μαρτύρων για τον φορέα. Εάν η προκαταρκτική μελέτη μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που έχει μορφοποιηθεί σε φορέα δεν αποκαλύψει τοξικότητα, θεωρείται ότι ο φορέας δεν είναι τοξικός στην ελεγχόμενη συγκέντρωση, οπότε θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μάρτυρας για τον φορέα αυτόν.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χορήγηση των συγκεντρώσεων

19. Τα ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία σε μορφή αερίου, ατμού, αερολύματος ή μείγματος αυτών. Η φυσική κατάσταση που ελέγχεται εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τις επιλεχθείσες συγκεντρώσεις και/ή τη φυσική μορφή που είναι πιθανότερο να υπάρχει κατά τον χειρισμό και τη χρήση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Υγροσκοπικές και χημικά δραστικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή υπό συνθήκες ξηρού αέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην παράγονται εκρηκτικές συγκεντρώσεις. Σωματιδιακά υλικά μπορούν να υποβάλλονται σε μηχανικές διαδικασίες ώστε να μειώνεται το μέγεθος των σωματιδίων. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

20. Πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων για όλα τα αερολύματα και για τους ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνωθούν σε αερολύματα. Για να είναι δυνατή η έκθεση όλων των σχετικών περιοχών της αναπνευστικής οδού, συνιστώνται αερολύματα με διάμεσο αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) που κυμαίνεται από 1 έως 3 μm με γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g) από 1,5 έως 3,0 (4). Παρόλο που θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για τη συμμόρφωση με το πρότυπο αυτό, εάν αυτό δεν είναι δυνατό θα πρέπει να πραγματοποιείται εμπειρογνωμοσύνη. Παραδείγματος χάριν, σωματίδια μεταλλικών καπνών μπορεί να υπολείπονται του προτύπου αυτού, ενώ φορτισμένα σωματίδια και ίνες ενδέχεται να το υπερβαίνουν.

▼M4

Παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε φορέα

21. Σε ιδανικές συνθήκες, η ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να ελέγχεται χωρίς φορέα. Εάν είναι απαραίτητη η χρήση φορέα για την παραγωγή κατάλληλης συγκέντρωσης και κατάλληλου μεγέθους σωματιδίων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θα πρέπει να προτιμάται το νερό. Κάθε φορά που μια ελεγχόμενη χημική ουσία διαλύεται σε νερό, πρέπει να καταδεικνύεται η σταθερότητά της.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΘΕΣΗΣ

Ροή αέρα στον θάλαμο

22. Η ροή του αέρα μέσω του θαλάμου έκθεσης πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται τουλάχιστον σε ωριαία βάση κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης. Η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της ελεγχόμενης συγκέντρωσης στην ατμόσφαιρα (ή χρονική σταθερότητα) είναι ολοκληρωτική μέτρηση όλων των δυναμικών παραμέτρων και αποτελεί έμμεσο τρόπο ελέγχου όλων των σχετικών δυναμικών αναπνευστικών παραμέτρων. Εάν η συγκέντρωση παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο, η συχνότητα μέτρησης των ροών αέρα μπορεί να μειωθεί σε μία μόνο μέτρηση ανά έκθεση ανά ημέρα. Θα πρέπει να αποφεύγεται η εκ νέου αναπνοή σε θαλάμους ρινικής έκθεσης. Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 19 % και η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 %. Εάν υπάρχει λόγος να θεωρείται ότι δεν μπορεί να υπάρξει συμμόρφωση με το πρότυπο αυτό, οι συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα πρέπει να μετρώνται. Εάν οι μετρήσεις κατά την πρώτη ημέρα έκθεσης δείχνουν ότι τα αέρια αυτά βρίσκονται σε κατάλληλα επίπεδα, δεν είναι απαραίτητο να εκτελούνται περαιτέρω μετρήσεις.

Θερμοκρασία και σχετική υγρασία του θαλάμου

23. Η θερμοκρασία του θαλάμου πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία στη ζώνη αναπνοής των ζώων, τόσο για ρινική όσο και για ολόσωμη έκθεση, θα πρέπει να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται ανά ώρα κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης, εφόσον είναι δυνατό. Η σχετική υγρασία θα πρέπει κατά προτίμηση να διατηρείται σε επίπεδα από 30 έως 70 %, αλλά αυτό μπορεί να είναι είτε ανέφικτο (π.χ. κατά τη δοκιμή μειγμάτων που έχουν ως βάση το νερό) ή μη μετρήσιμο λόγω της αλληλεπίδρασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με τη μέθοδο δοκιμών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: ονομαστική συγκέντρωση

24. Εάν είναι εφικτό, θα πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται η ονομαστική συγκέντρωση στον θάλαμο έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση ορίζεται ως η μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του συστήματος του θαλάμου εισπνοής. Η ονομαστική συγκέντρωση δεν χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης των ζώων, αλλά μια σύγκριση της ονομαστικής συγκέντρωσης και της πραγματικής συγκέντρωσης αποτελεί ένδειξη της αποτελεσματικότητας παραγωγής του συστήματος δοκιμών και, συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη προβλημάτων παραγωγής.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: πραγματική συγκέντρωση

25. Η πραγματική συγκέντρωση ορίζεται ως η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που λαμβάνεται από τη ζώνη αναπνοής των ζώων σε θάλαμο εισπνοής. Οι πραγματικές συγκεντρώσεις μπορούν να λαμβάνονται είτε με ειδικές μεθόδους (π.χ. άμεση δειγματοληψία, μέθοδοι προσρόφησης ή χημικής αντίδρασης και επακόλουθος αναλυτικός χαρακτηρισμός) είτε με μη ειδικές μεθόδους, όπως η σταθμική ανάλυση φίλτρου. Η χρήση σταθμικής ανάλυσης είναι αποδεκτή μόνο για αερολύματα σκόνης με ένα μέρος ή για αερολύματα υγρών χαμηλής πτητικότητας και θα πρέπει να υποστηρίζεται από κατάλληλους χαρακτηρισμούς της ελεγχόμενης ουσίας πριν από τη μελέτη. Η συγκέντρωση αερολυμάτων σκόνης με πολλά μέρη μπορεί επίσης να προσδιορίζεται με σταθμική ανάλυσης. Ωστόσο, απαιτούνται γι'

▼M4

αυτό αναλυτικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η σύνθεση του αερομεταφερόμενου υλικού είναι παρόμοια με το αρχικό υλικό. Εάν οι πληροφορίες αυτές δεν είναι διαθέσιμες, ενδέχεται να απαιτείται εκ νέου ανάλυση της ελεγχόμενης ουσίας (ιδανικά, στην αερομεταφερόμενη κατάσταση) ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Σε ουσίες σε μορφή αερολύματος που ενδέχεται να εξατμίζονται ή να εξαχνίζονται, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι όλες οι φάσεις έχουν συλλεχθεί με την επιλεχθείσα μέθοδο.

26. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία παρτίδα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, εάν είναι δυνατόν, και το ελεγχόμενο δείγμα θα πρέπει να αποθηκεύεται υπό συνθήκες που διατηρούν την καθαρότητά του, την ομοιογένειά του και τη σταθερότητά του. Πριν από την έναρξη της μελέτης, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να χαρακτηρίζεται, ως προς την καθαρότητά της και, εάν είναι τεχνικά εφικτό, ως προς την ταυτότητα και τις ποσότητες τυχόν εντοπισθέντων ρύπων και προσμείξεων. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί, μεταξύ άλλων, από τα ακόλουθα δεδομένα: χρόνος κατακράτησης και σχετική ζώνη κορυφής, μοριακό βάρος μέσω αναλύσεων φασματομετρίας μάζας ή αεριοχρωματογραφίας ή άλλες εκτιμήσεις. Παρόλο που η ταυτότητα του ελεγχόμενου δείγματος δεν αποτελεί ευθύνη του εργαστηρίου ελέγχου, θα ήταν σκόπιμο να επιβεβαιώνει το εργαστήριο τον χαρακτηρισμό από τον χορηγό, έστω και σε περιορισμένη έκταση (π.χ. χρώμα, φυσική κατάσταση κ.λπ.)

27. Η ατμόσφαιρα έκθεσης θα πρέπει να διατηρείται κατά το δυνατόν σταθερή. Μπορεί να χρησιμοποιείται συσκευή παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο, όπως φωτόμετρο αερολυμάτων για τα αερολύματα ή αναλυτής ολικών υδρογονανθράκων για τους ατμούς, ώστε να καταδεικνύεται η σταθερότητα των συνθηκών έκθεσης. Η πραγματική συγκέντρωση στον θάλαμο θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον 3 φορές κατά τη διάρκεια κάθε ημέρας έκθεσης για κάθε επίπεδο έκθεσης. Εάν δεν είναι εφικτό λόγω περιορισμένου ρυθμού ροής αέρα ή χαμηλών συγκεντρώσεων, είναι αποδεκτή η λήψη ενός δείγματος ανά περίοδο έκθεσης. Σε ιδανικές συνθήκες, το δείγμα αυτό θα πρέπει στη συνέχεια να συλλέγεται καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Τα δείγματα συγκέντρωσης από έναν μεμονωμένο θάλαμο δεν θα πρέπει να αποκλίνουν από τη μέση συγκέντρωση του θαλάμου περισσότερο από ± 10 %, προκειμένου για αέρια και ατμούς, ή ± 20 %, προκειμένου για υγρά ή στερεά αερολύματα. Ο χρόνος για την εξισορρόπηση του θαλάμου (t_{95}) πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται. Η διάρκεια μιας έκθεσης καλύπτει τον χρόνο παραγωγής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Λαμβάνονται υπόψη οι χρόνοι που απαιτούνται για την εξισορρόπηση του θαλάμου (t_{95}) και τη διάσπαση. Καθοδήγηση για την εκτίμηση του t_{95} παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

28. Στην περίπτωση πολύ πολύπλοκων μειγμάτων αποτελούμενων από αέρια/ατμούς και αερολύματα (π.χ. ατμόσφαιρες καύσης και ελεγχόμενες χημικές ουσίες εκπεμπόμενες από στοχοστρεφή προϊόντα/συσκευές τελικής χρήσης), κάθε φάση ενδέχεται να συμπεριφέρεται διαφορετικά σε θάλαμο εισπνοής. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να επιλέγεται τουλάχιστον μία ουσία δείκτης (αναλύτης), συνήθως το κύριο δραστικό συστατικό του μείγματος, από κάθε φάση (αέριο/ατμός και αερόλυμα). Όταν η ελεγχόμενη ουσία είναι μείγμα, η αναλυτική συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται για ολόκληρο το μείγμα και όχι μόνο για τη δραστική ουσία ή την ουσία-δείκτη (αναλύτης). Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις πραγματικές συγκεντρώσεις παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (2).

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

29. Η κατανομή μεγέθους σωματιδίων των αερολυμάτων θα πρέπει να προσδιορίζεται τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης με τη χρήση κρουστικού διαχωριστήρα ή εναλλακτικού οργάνου, όπως ο αεροδυναμικός κατανεμητής σωματιδίων (APS). Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται μέσω κρουστικού διαχωριστήρα και του εναλλακτικού οργάνου, το εναλλακτικό όργανο μπορεί να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

▼M4

30. Παράλληλα με το κύριο όργανο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια δεύτερη συσκευή, όπως ένα σταθμικό φίλτρο ή πλυντρίδα αερίου/φυσαλιδοδείκτης, για να επιβεβαιώνει την απόδοση συλλογής του κύριου οργάνου. Η συγκέντρωση μάζας που λαμβάνεται μέσω ανάλυσης μεγέθους σωματιδίων θα πρέπει να είναι εντός των εύλογων ορίων συγκέντρωσης μάζας που λαμβάνονται μέσω ανάλυσης με φίλτρο [βλέπε GD 39 (2)]. Εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ισοδυναμία σε όλες τις ελεγχόμενες συγκεντρώσεις σε αρχικό στάδιο της μελέτης, οι περαιτέρω επιβεβαιωτικές μετρήσεις μπορούν να παραλείπονται. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε να ελαχιστοποιούνται τα αβέβαια δεδομένα που ενδέχεται να οδηγούν σε ανάγκη επανάληψης μιας μελέτης.

31. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων στην περίπτωση των ατμών, εάν υπάρχει πιθανότητα η συμπύκνωση των ατμών να οδηγήσει στον σχηματισμό αερολύματος ή εάν εντοπίζονται σε ατμόσφαιρα ατμού σωματίδια με δυναμικό πρόκλησης μεικτών φάσεων.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

32. Τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε κλινική εξέταση πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την περίοδο έκθεσης. Μπορεί να ενδείκνυνται συχνότερες παρατηρήσεις ανάλογα με την αντίδραση των ζώων κατά τη διάρκεια της έκθεσης. Όταν δεν είναι δυνατή η παρατήρηση των ζώων λόγω της χρήσης σωλήνων συγκράτησης, ανεπαρκούς φωτισμού των θαλάμων ολόσωμης έκθεσης ή αδιαφανούς ατμόσφαιρας, θα πρέπει να παρατηρούνται προσεκτικά τα ζώα μετά την έκθεση. Μέσω παρατηρήσεων πριν από την έκθεση της επόμενης ημέρας μπορεί να αξιολογηθεί τυχόν αναστρεψιμότητα ή επιδείνωση των τοξικών επιδράσεων.

33. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται χωριστά για κάθε ζώο. Ο χρόνος θανάτου των ζώων που έχουν θανατωθεί προκειμένου να μην ταλαιπωρηθούν ή που έχουν βρεθεί νεκρά καταγράφεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

34. Οι παρατηρήσεις στον κλωβό θα πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, αλλαγές στο αναπνευστικό και κυκλοφοριακό σύστημα, αλλαγές στο νευρικό σύστημα, καθώς και αλλαγές στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην παρατήρηση τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του ορθού μπορεί να παρέχει υποστηρικτικά αποδεικτικά στοιχεία αντανακλαστικής βραδύπνοιας ή υποθερμίας/υπερθερμίας που σχετίζεται με την αγωγή ή τη στέρηση της ελευθερίας. Μπορούν να περιλαμβάνονται επίσης στο πρωτόκολλο της μελέτης πρόσθετες αξιολογήσεις σχετικά, μεταξύ άλλων, με την κινητική, τη βιοπαρακολούθηση, τη λειτουργία πνευμόνων, τη συγκράτηση δυσδιάλυτων υλικών που συσσωρεύονται στους ιστούς των πνευμόνων και αλλαγές στη συμπεριφορά.

ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ

35. Θα πρέπει να καταγράφεται το βάρος κάθε ζώου λίγο πριν από την πρώτη έκθεση (ημέρα 0) και, στη συνέχεια, δύο φορές την εβδομάδα (παραδείγματος χάριν κάθε Παρασκευή και Δευτέρα ώστε να καταδεικνύεται η ανάρρωση μετά από Σαββατοκύριακο χωρίς έκθεση ή ανά χρονικό διάστημα που επιτρέπει την αξιολόγηση της συστημικής τοξικότητας), καθώς και κατά τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας. Εάν δεν εμφανιστούν επιδράσεις κατά τις πρώτες 4 εβδομάδες, το βάρος του σώματος των ζώων μπορεί να μετράται σε εβδομαδιαία βάση για το υπόλοιπο της μελέτης. Η ζύγιση των δορυφορικών ζώων (αναστρεψιμότητας), εφόσον χρησιμοποιούνται, θα πρέπει να συνεχίζεται σε εβδομαδιαία βάση καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου ανάρρωσης. Κατά την ολοκλήρωση της μελέτης, θα πρέπει να ζυγίζονται όλα τα ζώα λίγο πριν από τη θανάτωση ώστε να υπολογίζονται χωρίς συστηματικά σφάλματα οι σχέσεις βάρους οργάνων-σώματος.

ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΝΕΡΟΥ

36. Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται σε εβδομαδιαία βάση. Μπορεί επίσης να μετράται η κατανάλωση νερού.

▼M4

ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

37. Θα πρέπει να πραγματοποιούνται εκτιμήσεις κλινικής παθολογίας για όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των ζώων-μαρτύρων και των δορυφορικών ζώων (αναστρεψιμότητας), κατά τη θανάτωσή τους. Το χρονικό διάστημα από το τέλος της έκθεσης έως την αιμοληψία θα πρέπει να καταγράφεται, ιδίως όταν η αποκατάσταση του εξεταζόμενου καταληκτικού σημείου είναι ταχεία. Ενδείκνυται η πραγματοποίηση δειγματοληψίας μετά το τέλος της έκθεσης όσον αφορά τις παραμέτρους με βραχύ χρόνο υποδιπλασιασμού πλάσματος (π.χ. COHb, CHE και MetHb).

38. Στον πίνακα 1 παρατίθενται παράμετροι κλινικής παθολογίας που απαιτούνται γενικά σε όλες τις τοξικολογικές μελέτες. Δεν απαιτείται τακτικά ανάλυση ούρων, αλλά μπορεί να διενεργείται όταν κρίνεται χρήσιμο βάσει στοιχείων αναμενόμενης ή παρατηρούμενης τοξικότητας. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να αξιολογήσει πρόσθετες παραμέτρους για τον καλύτερο χαρακτηρισμό της τοξικότητας μιας χημικής ουσίας (π.χ. χολινεστεράση, λιπίδια, ορμόνες, οξεοβασική ισορροπία, μεθαιμοσφαιρίνη ή σωμάτια Heinz, κινάση της κρεατίνης, λόγος μυελικών κυττάρων/ερυθρών αιμοσφαιρίων, τροπονίνες, αέρια αρτηριακού αίματος, γαλακτική αφυδρογονάση, αφυδρογονάση σορβιτόλης, γλουταμική αφυδρογονάση και γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση).

Πίνακας 1

Τυπικές παράμετροι κλινικής παθολογίας

Αιματολογικές εξετάσεις	
Αριθμός ερυθροκυττάρων	Συνολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων
Αιματοκρίτης	Λευκοκυτταρικός τύπος
Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης	Αριθμός αιμοπεταλίων
Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης	Πηκτικότητα (να επιλεγεί ένα):
Μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων	— Χρόνος προθρομβίνης
Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης	— Χρόνος πήξης
Δικτυοερυθροκύτταρα	— Μερικός χρόνος θρομβοπλαστίνης
Κλινική χημεία	
Γλυκόζη (*)	Αλανινο-αμινοτρανσφεράση
Ολική χοληστερόλη	Ασπαργινική αμινοτρανσφεράση
Τριγλυκερίδια	Αλκαλική φωσφατάση
Άζωτο ουρίας αίματος	Κάλιο
Ολική χολερυθρίνη	Νάτριο
Κρεατινίνη	Ασβέστιο
Ολικές πρωτεΐνες	Φωσφόρος
Αλβουμίνη	Χλωριούχα
Σφαιρίνη	
Ανάλυση ούρων (προαιρετικά)	
Όψη (χρώμα και θολερότητα)	Ολικές πρωτεΐνες
Όγκος	Γλυκόζη
Ειδικό βάρος ή ωσμοτικότητα	Αίμα/Αιμοκύτταρα
pH	

(*) Δεδομένου ότι η μακρά περίοδος νηστείας μπορεί να επηρεάζει τις μετρήσεις γλυκόζης των ζώων που υποβάλλονται σε αγωγή σε σχέση με τα ζώα-μάρτυρες ο διευθυντής της μελέτης θα πρέπει να αποφασίσει εάν τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε νηστεία. Εάν εφαρμόζεται περίοδος νηστείας, θα πρέπει να είναι κατάλληλη για τα χρησιμοποιούμενα είδη. Στην περίπτωση των επιμύων, η περίοδος αυτή μπορεί να είναι 16 ώρες (νηστεία κατά τη διάρκεια της νύχτας πριν από την αιμοληψία). Ο προσδιορισμός της γλυκόζης μετά από νηστεία μπορεί να διενεργείται μετά από ολονύχτια νηστεία κατά την τελευταία εβδομάδα έκθεσης ή μετά από ολονύχτια νηστεία πριν από τη νεκροψία (στη δεύτερη περίπτωση, μαζί με τη μέτρηση όλων των άλλων παραμέτρων κλινικής παθολογίας).

▼**M4**

39. Εάν υπάρχουν ενδείξεις απόθεσης και κατακράτησης κυρίως στην κατώτερη αναπνευστική οδό (ήτοι, στις κυψελίδες), το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) μπορεί να αποτελεί την προτιμότερη τεχνική για την ποσοτική ανάλυση παραμέτρων δόσης-επιδράσεων βάσει υποθέσεων, με εστίαση στην κυψελίτιδα, την πνευμονική φλεγμονή και τη φωσφολιπίδωση. Με τον τρόπο αυτόν διερευνώνται κατάλληλα οι αλλαγές στις κακώσεις των κυψελίδων βάσει δόσης-απόκρισης και χρονικής διάρκειας. Το υγρό του BAL μπορεί να υποβληθεί σε ανάλυση για τον προσδιορισμό του αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων και λευκοκυτταρικού τύπου, των ολικών πρωτεϊνών και της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Άλλες παράμετροι που μπορούν να εξετάζονται είναι αυτές που παρέχουν ενδείξεις κακώσεων των λυσοσωμάτων, φωσφολιπίδωσης, ίνωσης και ερεθιστικής ή αλλεργικής φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού προ-φλεγμονωδών κυτοκινών/χημοκινών. Οι μετρήσεις BAL συμπληρώνουν γενικά τα αποτελέσματα των ιστοπαθολογικών εξετάσεων αλλά δεν μπορούν να τις αντικαταστήσουν. Καθοδήγηση για τον τρόπο έκπλυσης των πνευμόνων παρέχει το έγγραφο GD 39 (2).

ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

40. Πρέπει να διενεργείται, με τη χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου οργάνου, οφθαλμολογική εξέταση του βυθού, των διαθλαστικών μέσων, της ίριδας και του επιπεφυκότος του οφθαλμού, πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας σε όλα τα ζώα, και κατά τη λήξη της μελέτης, στις ομάδες υψηλής συγκέντρωσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Εάν εντοπιστούν αλλαγές στους οφθαλμούς, θα πρέπει να εξεταστούν όλα τα ζώα των άλλων ομάδων, συμπεριλαμβανομένης της δορυφορικής ομάδας (αναστρεψιμότητας).

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΒΑΡΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

41. Όλα τα πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένων των θανόντων κατά τη διάρκεια της δοκιμής και εκείνων που αποσύρθηκαν από τη μελέτη για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, υποβάλλονται σε πλήρη αφαίμαξη (εάν είναι εφικτό) και ολική νεκροψία. Θα πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ του τέλους της τελευταίας έκθεσης κάθε ζώου και της θανάτωσής του. Εάν δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί νεκροψία αμέσως μετά την ανακάλυψη κάποιου νεκρού ζώου, το ζώο θα πρέπει να ψύχεται (όχι να καταψύχεται) σε θερμοκρασίες αρκετά χαμηλές ώστε να ελαχιστοποιείται η αυτόλυση. Η νεκροψία θα πρέπει να εκτελείται όσο το δυνατόν συντομότερα, κατά κανόνα εντός μιας ή δύο ημερών. Όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις θα πρέπει να καταγράφονται για κάθε ζώο, δίδοντας ιδιαίτερη προσοχή σε τυχόν αλλοιώσεις της αναπνευστικής οδού.

42. Στον πίνακα 2 αναφέρονται τα όργανα και οι ιστοί που θα πρέπει να διατηρούνται σε κατάλληλο μέσο κατά τη νεκροψία, για ιστοπαθολογική εξέταση. Η διατήρηση των οργάνων και ιστών που αναφέρονται [εντός αγκίστρων] και τυχόν άλλων οργάνων και ιστών εναπόκειται στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Τα όργανα που αναφέρονται με **έντονους χαρακτήρες** θα πρέπει να καθαρίζονται από ιστούς και να ζυγίζονται σε νωπή κατάσταση το συντομότερο δυνατό μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Ο θυρεοειδής και οι επιδιδυμίδες θα πρέπει να ζυγίζονται μόνο εάν χρειάζεται, διότι τεχνητές ενδείξεις που συνδέονται με τον καθαρισμό ενδέχεται να εμποδίζουν την ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Οι ιστοί και τα όργανα θα πρέπει να μονιμοποιούνται σε φορμαλίνη με ρυθμιστικό διάλυμα 10 % ή άλλο κατάλληλο μονιμοποιητικό υλικό, αμέσως μετά τη νεκροψία και τουλάχιστον 24-48 ώρες πριν από τον καθαρισμό από ιστούς, ανάλογα με το μονιμοποιητικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί.

▼M4

Πίνακας 2

Διατηρούμενα όργανα και ιστοί κατά τη νεκροψία

Επινεφρίδια	Οισοφάγος
Αορτή	[Οσφρητικός βολβός]
Μυελός των οστών (και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών)	**Ωοθήκες**
Εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	Πάγκρεας
Τυφλό έντερο	Παραθυρεοειδείς
Κόλον	Περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο, κατά προτίμηση κοντά στο μυ)
Δωδεκαδάκτυλο	Υπόφυση
[**Επιδιδυμίδες**]	Προστάτης
[Οφθαλμοί (αμφιβληστροειδής, οπτικό νεύρο) και βλέφαρα]	Ορθό
Μηριαίο οστό και κνημομηριαία άρθρωση	Σιελογόνοι αδένες
Χοληδόχος κύστη (όπου υπάρχει)	Σπερματοδόχες κύστεις
[Αδένες Harderian]	Δέρμα
Καρδιά	Νωτιαίος μυελός (αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)
Ειλεός	**Σπλήνα**
Νήστις	Στέρνο
Νεφροί	Στομάχι
[Δακρυγόνοι αδένες (εξωβολβικοί)]	Δόντια
Λάρυγγας (3 επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της βάσης της επιγλωττίδας)	**Όρχεις**
Ήπαρ	**Θύμος αδένας**
Πνεύμονας (όλοι οι λοβοί σε ένα επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων των κυρίων βρόγχων)	**Θυρεοειδείς αδένες**
Λεμφαδένες από την πυλαία περιοχή του πνεύμονα, ιδίως στην περίπτωση δυσδιάλυτων ελεγχόμενων χημικών ουσιών σε σωματιδιακή μορφή. Για περισσότερο ενδελεχείς εξετάσεις και/ή μελέτες με ανοσολογική εστίαση, εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης περισσότερων λεμφαδένων, π.χ. από τη μεσοθωρακική, την αυχενική/την υπογνάθια και/ή την ωτική περιοχή.	[Γλώσσα]
	Τραχεία (τουλάχιστον 2 επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης 1 διαμήκους τομής μέσω της τρόπιδας και 1 εγκάρσιας τομής)
Λεμφαδένες (σε απόσταση από το σημείο εισόδου)	[Ουρητήρας]
Μαστικός αδένας (θηλυκά ζώα)	[Ουρήθρα]
Μυς (μηρός)	Ουροδόχος κύστη
Ρινοφαρυγγικοί ιστοί (τουλάχιστον 4 επίπεδα· 1 επίπεδο πρέπει να περιλαμβάνει το ρινοφαρυγγικό πόρο και τον λεμφικό ιστό που συνοδεύει τη ρινική κοιλότητα (NALT).	**Μήτρα**
	Όργανα-στόχοι
	Όλες οι μακροσκοπικές βλάβες και μάζες

▼M4

43. Οι πνεύμονες θα πρέπει να αφαιρούνται άθικτοι, να ζυγίζονται και να διαποτίζονται με κατάλληλο μονιμοποιητικό υλικό σε πίεση 20-30 cm στήλης ύδατος ώστε να εξασφαλίζεται η διατήρηση της δομής τους (5). Πρέπει να συλλέγονται τομές όλων των λοβών σε ένα επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων των κυρίων βρόγχων, αλλά σε περίπτωση έκπλυσης των πνευμόνων, ο λοβός που δεν έχει εκπλυθεί θα πρέπει να τέμνεται σε τρία επίπεδα (όχι σειριακές τομές).

44. Θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον 4 επίπεδα των ρινοφαρυγγικών ιστών, ένα από τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνει το ρινοφαρυγγικό πόρο (5) (6) (7) (8) (9) ώστε να εξετάζεται επαρκώς το πλακώδες, το μεταβατικό (μη βλεφαριδοφόρο αναπνευστικό), το αναπνευστικό (βλεφαριδοφόρο αναπνευστικό) και το οσφρητικό επιθήλιο, και ο αποχετευτικός λεμφικός ιστός (NALT) (10) (11). Θα πρέπει να εξετάζονται τρία επίπεδα του λάρυγγα, ένα από τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνει τη βάση της επιγλωττίδας (12). Θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο επίπεδα της τραχείας, συμπεριλαμβανομένης μιας διαμήκους τομής, μέσω της τρόπιδας, της διακλάδωσης των εξωπνευμονικών βρόχων και μιας εγκάρσιας τομής.

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

45. Θα πρέπει να διενεργείται ιστοπαθολογική αξιολόγηση όλων των οργάνων και ιστών που αναφέρονται στον πίνακα 2 για την ομάδα μάρτυρα και την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και για όλα τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην αναπνευστική οδό, τα όργανα-στόχο και τις μακροσκοπικές βλάβες. Τα όργανα και οι ιστοί που παρουσιάζουν βλάβες στην ομάδα υψηλής συγκέντρωσης θα πρέπει να εξετάζονται σε όλες τις ομάδες. Ο διευθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να διενεργήσει ιστοπαθολογική αξιολόγηση επιπρόσθετων ομάδων ώστε να καταδειχθεί σαφής σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης. Σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί δορυφορική ομάδα (αναστρεψιμότητας), απαιτείται ιστοπαθολογική αξιολόγηση όλων των ιστών και των οργάνων που έχουν παρουσιάσει αλλοιώσεις στα ζώα των ομάδων αγωγής. Εάν προκληθεί υπερβολικός αριθμός πρώιμων θανάτων ή άλλων προβλημάτων στην ομάδα υψηλής έκθεσης που επηρεάζουν αρνητικά τη σημασία των δεδομένων, θα πρέπει να διενεργηθεί ιστοπαθολογική εξέταση στην ομάδα με την αμέσως χαμηλότερη συγκέντρωση. Θα πρέπει να επιχειρείται συσχετισμός των μακροσκοπικών παρατηρήσεων με τα μικροσκοπικά ευρήματα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Στοιχεία

46. Θα πρέπει να παρέχονται στοιχεία για κάθε ζώο σχετικά με το βάρος του, την τροφή που κατανάλωσε, την κλινική παθολογία, την παθολογοανατομία, το βάρος των οργάνων του και την ιστοπαθολογία. Τα στοιχεία κλινικής παρατήρησης πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των χρησιμοποιηθέντων ζώων, τον αριθμό των ζώων που εμφανίζουν συγκεκριμένες τοξικές εκδηλώσεις, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή που θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και χρονική πορεία των τοξικών εκδηλώσεων, αναστρεψιμότητα και ευρήματα νεκροψίας. Όλα τα αποτελέσματα, ποσοτικά και συμπτωματικά, πρέπει να αξιολογούνται με μια κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε γενικά αποδεκτή στατιστική μέθοδος, ενώ οι στατιστικές μέθοδοι θα πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης.

Έκθεση δοκιμής

47. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Πειραματόζωα και διαχείρισή τους

— περιγραφή των συνθηκών εγκλωβισμού, συμπεριλαμβανομένων των εξής: αριθμό (ή μεταβολή του αριθμού) ζώων ανά κλωβό, στρωμνή, θερμοκρασία και σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, φωτοπερίοδο και προσδιορισμό του σιτηρεσίου,

▼M4

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης άλλου είδους εκτός του επίμυ· μπορούν να παρέχονται πηγές και ιστορικά δεδομένα, εφόσον αφορούν ζώα που έχουν υποβληθεί σε παρόμοιες συνθήκες έκθεσης, στέγασης και στέρησης τροφής,

— αριθμός ηλικία και φύλο των ζώων,

— μέθοδος τυχαιοποίησης,

— περιγραφή τυχόν προετοιμασίας πριν από τον έλεγχο, μεταξύ άλλων του σιτηρεσίου, της περιόδου απομόνωσης και της αγωγής για ασθένειες.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, κατά περίπτωση, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης),

— στοιχεία αναγνώρισης και αριθμός CAS, εάν είναι γνωστός.

Φορέας

— αιτιολόγηση χρήσης του φορέα και αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα (εάν δεν είναι νερό),

— προϋπάρχοντα ή παράλληλα δεδομένα που καταδεικνύουν ότι ο φορέας δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της μελέτης.

Θάλαμος εισπνοής

— αναλυτική περιγραφή του θαλάμου εισπνοής, μεταξύ άλλων του όγκου και ενός διαγράμματος,

— πηγή και περιγραφή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την έκθεση ζώων, καθώς και για την παραγωγή της ατμόσφαιρας,

— εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας, του μεγέθους των σωματιδίων και της πραγματικής συγκέντρωσης,

— πηγή αέρα και χρησιμοποιούμενο σύστημα κλιματισμού,

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση του εξοπλισμού ώστε να εξασφαλίζεται ομοιογενής πειραματική ατμόσφαιρα,

— διαφορά πίεσης (θετική ή αρνητική),

— θύρες έκθεσης ανά θάλαμο (ρινική έκθεση)· θέση των ζώων στο σύστημα (ολόσωμη έκθεση),

— σταθερότητα της πειραματικής ατμόσφαιρας,

— θέση των αισθητήρων θερμοκρασίας και υγρασίας και δειγματοληψία της πειραματικής ατμόσφαιρας στον θάλαμο,

— επεξεργασία του παρεχόμενου/εξαγόμενου αέρα,

— ταχύτητες ροής αέρα, ταχύτητα ροής αέρα/θύρα έκθεσης (ρινική έκθεση) ή φορτίο ζώων/θάλαμο (ολόσωμη έκθεση),

— χρόνος για την επίτευξη ισορροπίας στον θάλαμο εισπνοής (t95),

— αριθμός μεταβολών όγκου ανά ώρα,

— συσκευές μέτρησης (κατά περίπτωση).

Δεδομένα έκθεσης

— αιτιολόγηση της επιλογής της συγκέντρωσης στόχου για την κυρίως μελέτη,

▼M4

— ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσα στον θάλαμο εισπνοής διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του θαλάμου),

— πραγματικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που λαμβάνονται από τη ζώνη αναπνοής των ζώων· για μείγματα που παράγουν ετερογενείς φυσικές μορφές (αέρια, ατμούς, αερολύματα), κάθε μορφή μπορεί να αναλύεται χωριστά,

— όλες οι ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αναφέρονται σε μονάδες μάζας (mg/l mg/m^3 κ.λπ.) αντί να αναφέρονται σε μονάδες όγκου (ppm, ppb κ.λπ.),

— κατανομή μεγέθους σωματιδίων διάμεσος αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) και γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g), συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων υπολογισμού τους. Θα πρέπει να αναφέρονται επιμέρους αναλύσεις μεγέθους σωματιδίων.

Συνθήκες δοκιμής

— λεπτομερή στοιχεία της παρασκευής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένων λεπτομερών στοιχείων διαδικασιών που έχουν ενδεχομένως χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του μεγέθους στερεών υλικών ή για την παρασκευή διαλυμάτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— περιγραφή (κατά προτίμηση μαζί με διάγραμμα) του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της ατμόσφαιρας ελέγχου και την έκθεση των ζώων στην ατμόσφαιρα ελέγχου,

— λεπτομερή στοιχεία του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της θερμοκρασίας του θαλάμου, της υγρασίας και της ροής αέρα στον θάλαμο (ανάπτυξη καμπύλης βαθμονόμησης),

— λεπτομερή στοιχεία του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή δειγμάτων ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και η κατανομή μεγέθους σωματιδίων στον θάλαμο,

— λεπτομερή στοιχεία της χημικής αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε και επικύρωση της μεθόδου (συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας ανάκτησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το μέσο δειγματοληψίας),

— μέθοδος τυχαιοποίησης κατά την κατανομή των ζώων στις ομάδες αγωγής και μαρτύρων,

— λεπτομερή στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων του είδους και της πηγής του σιτηρεσίου και της πηγής του νερού),

— αιτιολόγηση των επιλεγμένων συγκεντρώσεων ελέγχου.

Αποτελέσματα

— πίνακας με τη θερμοκρασία, την υγρασία και τη ροή αέρα στον θάλαμο,

— πίνακας με τα στοιχεία ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων στον θάλαμο,

— πίνακας με τα στοιχεία μεγέθους σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων συλλογής του δείγματος ανάλυσης, της κατανομής μεγέθους σωματιδίων και υπολογισμών της MMAD και της σ_g,

— πίνακας με τα δεδομένα απόκρισης και το επίπεδο συγκέντρωσης για κάθε ζώο (δηλαδή ζώα που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, της φύσης, της σοβαρότητας, του χρόνου εμφάνισης και της διάρκειας των επιδράσεων),

▼**M4**

— πίνακας με το βάρος κάθε ζώου,

— πίνακας με την κατανάλωση τροφής,

— πίνακας με δεδομένα κλινικής παθολογίας,

— ευρήματα νεκροψίας και ιστοπαθολογικά ευρήματα για καθένα από τα ζώα, εφόσον διατίθενται.

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

— Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δίδεται στην περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπλήρωση των κριτηρίων της μεθόδου δοκιμών, π.χ. της οριακής συγκέντρωσης ή του μεγέθους σωματιδίων.

— Θα πρέπει να καλύπτεται το ζήτημα της εισπνευσιμότητας των σωματιδίων βάσει των συνολικών ευρημάτων, ιδίως εάν τα σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων κριτήρια δεν ήταν δυνατό να εκπληρωθούν.

— Η συνολική αξιολόγηση της μελέτης πρέπει να περιλαμβάνει τη συνοχή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων και τη σχέση της πραγματικής προς την ονομαστική συγκέντρωση.

— Θα πρέπει να αναφέρεται η πιθανή αιτία θανάτου και ο επικρατέστερος τρόπος δράσης (συστημική δράση έναντι τοπικής).

— Θα πρέπει να παρέχεται εξήγηση εάν έπρεπε να θανατωθούν με ευθανασία ζώα που πονούσαν ή που εμφάνιζαν εκδηλώσεις έντονης και διαρκούς δυσφορίας, βάσει των κριτηρίων του εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (3).

— Θα πρέπει να προσδιορίζεται το(τα) όργανο(-α)-στόχος.

— Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι τιμές NOAEL και LOAEL.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (1981), *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009), *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan E. και Redden J.C. (1994), Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies, Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985), Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) στο *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. και Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young J.T. (1981), Histopathological examination of the rat nasal cavity, *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309-312.

(7) Harkema J.R. (1990), Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants, *Environ. Health Perspect.* 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994), Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans, στο: Waalkes M.P. και Ward J.M. (eds), Carcinogenesis, Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994), Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice, *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992), The role of nasopharyngeal lymphoid tissue, *Immunol. Today* 13: 219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003), Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue, *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.

(12) Lewis D.J. (1981), Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia, *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.

(13) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 (ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1).

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M4

Β.30. ΜΕΛΕΤΕΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 452 του ΟΟΣΑ (2009). Η αρχική κατευθυντήρια γραμμή TG 452 εκδόθηκε το 1981. Θεωρήθηκε απαραίτητο να αναπτυχθεί η παρούσα αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών Β.30 ώστε να αντανακλά τις πλέον πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της καλής μεταχείρισης των ζώων και τις κανονιστικές απαιτήσεις (1) (2) (3) (4). Η επικαιροποίηση της παρούσας μεθόδου δοκιμών Β.30 διενεργήθηκε παράλληλα με τις αναθεωρήσεις του κεφαλαίου Β.32 «Μελέτες καρκινογενετικότητας» και του κεφαλαίου Β.33 «Συνδυασμένες μελέτες χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας» του παρόντος παραρτήματος με στόχο τη λήψη πρόσθετων πληροφοριών από τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και την παροχή περαιτέρω λεπτομερών στοιχείων για την επιλογή των δόσεων. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί ώστε να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ενός ευρέος φάσματος χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων φυτοφαρμάκων και βιομηχανικών χημικών ουσιών.

2. Στην πλειονότητά τους, οι μελέτες χρόνιας τοξικότητας διεξάγονται σε είδη τρωκτικών. Επομένως και η παρούσα μέθοδος δοκιμών πρόκειται να εφαρμοστεί κυρίως σε μελέτες που αφορούν αυτά τα είδη. Εάν απαιτείται η διεξαγωγή τέτοιων μελετών σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, μπορούν επίσης να εφαρμόζονται οι αρχές και οι διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, μαζί με αυτές που περιγράφονται στο κεφάλαιο Β.27 «Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά» του παρόντος παραρτήματος (5), με κατάλληλες τροποποιήσεις, όπως περιγράφεται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ για τον σχεδιασμό και τη διεξαγωγή μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας.

3. Οι τρεις βασικές οδοί χορήγησης ουσιών που χρησιμοποιούνται σε μελέτες χρόνιας τοξικότητας είναι μέσω του στόματος, μέσω του δέρματος και μέσω της εισπνοής. Η επιλογή οδού χορήγησης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την κύρια οδό έκθεσης του ανθρώπου. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδού έκθεσης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (6).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εστιάζει στην έκθεση μέσω του στόματος, τη συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη οδό στις μελέτες χρόνιας τοξικότητας. Παρόλο που οι μακροπρόθεσμες μελέτες χρόνιας τοξικότητας που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω του δέρματος ή της αναπνευστικής οδού ενδέχεται να είναι επίσης απαραίτητες για την εκτίμηση των κινδύνων για την υγεία και/ή ενδέχεται να απαιτούνται βάσει συγκεκριμένων ρυθμιστικών καθεστώτων, και οι δύο οδοί έκθεσης είναι τεχνικά πολύπλοκες σε σημαντικό βαθμό. Παρόλο που οι μελέτες αυτές θα πρέπει να σχεδιάζονται κατά περίπτωση, η μέθοδος δοκιμών που περιγράφεται στο παρόν κεφάλαιο για την εκτίμηση και την αξιολόγηση της χρόνιας τοξικότητας που προκαλείται με χορήγηση από το στόμα θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση ενός πρωτοκόλλου για αναπνευστικές και/ή δερματικές μελέτες όσον αφορά συστάσεις για περιόδους αγωγής, κλινικές και παθολογικές παραμέτρους κ.λπ. Ο ΟΟΣΑ έχει εκδώσει έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με τη χορήγηση ελεγχόμενων χημικών ουσιών μέσω της αναπνευστικής οδού (6)(7) και μέσω του δέρματος (6). Το κεφάλαιο Β.8 (8) και το κεφάλαιο Β.29 (9) του παρόντος παραρτήματος, καθώς και το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (7), θα πρέπει να λαμβάνονται ιδιαιτέρως υπόψη κατά τον σχεδιασμό πιο μακροπρόθεσμων μελετών που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού. Το κεφάλαιο Β.9 του παρόντος παραρτήματος (10) θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαιτέρως υπόψη στην περίπτωση δοκιμών μέσω του δέρματος.

▼M4

5. Η μελέτη χρόνιας τοξικότητας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους για την υγεία που ενδέχεται να προκύπτουν από την επανειλημμένη έκθεση για ένα σημαντικό χρονικό διάστημα της ζωής του χρησιμοποιούμενου είδους. Η μελέτη παρέχει πληροφορίες για τις τοξικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, για ενδεχόμενα όργανα-στόχο και για την πιθανότητα συσσώρευσης. Επίσης μπορεί να παρέχει εκτίμηση του επιπέδου NOAEL (επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κριτηρίων ασφάλειας για την έκθεση του ανθρώπου. Τονίζεται επίσης η ανάγκη προσεκτικής κλινικής παρατήρησης των πειραματόζωων προκειμένου να ληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες.

6. Οι στόχοι των μελετών που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνουν:

— τον προσδιορισμό της χρόνιας τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— τον προσδιορισμό οργάνων στόχου,

— τον χαρακτηρισμό της σχέσης δόσης-απόκρισης,

— τον προσδιορισμό του επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL) ή της αφετηρίας για τον καθορισμό δόσης αναφοράς (BMD),

— την πρόβλεψη επιδράσεων χρόνιας τοξικότητας στα επίπεδα έκθεσης του ανθρώπου,

— την παροχή δεδομένων για τον έλεγχο υποθέσεων σχετικά με τον τρόπο δράσης (6).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Κατά την εκτίμηση και την αξιολόγηση των τοξικολογικών χαρακτηριστικών μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, το πειραματικό εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, ώστε να εστιάζεται ο σχεδιασμός στον πλέον αποδοτικό έλεγχο του δυναμικού χρόνιας τοξικότητας και να ελαχιστοποιείται η χρήση των ζώων. Πληροφορίες που θα βοηθήσουν στον σχεδιασμό της μελέτης είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας· οποιεσδήποτε πληροφορίες για τον τρόπο δράσης· τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας in vitro ή in vivo· οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου· τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR και τα τοξικολογικά δεδομένα που αφορούν χημικά προϊόντα ανάλογης δομής· διαθέσιμα τοξικοκινητικά δεδομένα (κινητική μεμονωμένης δόσης και επανειλημμένων δόσεων, εφόσον είναι διαθέσιμα) και δεδομένα που προέρχονται από άλλες μελέτες επανειλημμένης έκθεσης. Ο προσδιορισμός της χρόνιας τοξικότητας πρέπει να πραγματοποιείται μόνο μετά τη λήψη αρχικών πληροφοριών για την τοξικότητα μέσω δοκιμών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εφαρμογής μιας κλιμακωτής πειραματικής προσέγγισης για τον έλεγχο της χρόνιας τοξικότητας στο πλαίσιο της συνολικής αξιολόγησης των ενδεχόμενων δυσμενών επιδράσεων μιας συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην υγεία (11) (12) (13) (14).

8. Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι πλέον κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεδομένου του σχεδιασμού και των στόχων του πειράματος, πριν από την έναρξη της μελέτης. Στα ζητήματα που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη είναι εάν τα στατιστικά στοιχεία θα πρέπει να περιλαμβάνουν διορθώσεις βάσει των ζώων που επιβιώνουν και ανάλυση στην περίπτωση πρόωρου τερματισμού μιας ή περισσότερων ομάδων. Κατευθύνσεις για τις κατάλληλες στατιστικές αναλύσεις και βασικές παραπομπές σε διεθνώς αποδεκτές στατιστικές μεθόδους περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (6) και στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 35 για την ανάλυση και την αξιολόγηση μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (15).

▼M4

9. Κατά τη διεξαγωγή μελέτης χρόνιας τοξικότητας, θα πρέπει να ακολουθούνται πάντα οι κατευθυντήριες αρχές και εκτιμήσεις που περιγράφονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ για την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών ενδείξεων ως λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία για τα χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα στην αξιολόγηση ασφαλείας (16), και ιδίως η παράγραφος 62 του εγγράφου αυτού. Η παράγραφος αυτή αναφέρει ότι «Σε μελέτες που περιλαμβάνουν επανειλημμένες χορηγήσεις, όταν ένα ζώο εμφανίζει κλινικές ενδείξεις που είναι προοδευτικές και οδηγούν σε περαιτέρω επιδείνωση της κατάστασής του, θα πρέπει να λαμβάνεται μια τεκμηριωμένη απόφαση σχετικά με το εάν πρέπει να γίνει ευθανασία στο ζώο ή όχι. Η απόφαση θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη ζητήματα σχετικά με την αξία των πληροφοριών που θα ληφθούν από τη συνέχιση της συμμετοχής του ζώου αυτού στη μελέτη σε σχέση με τη συνολική του κατάσταση. Εάν ληφθεί απόφαση να εξακολουθήσει το ζώο να υποβάλλεται σε δοκιμή, θα πρέπει να αυξάνεται η συχνότητα των παρατηρήσεων, ανάλογα με τις ανάγκες. Επίσης ενδέχεται να διακόπτεται προσωρινά η χορήγηση δόσεων, εάν αυτό θα απαλύνει τον πόνο ή τη δυσφορία, ή να μειώνεται η δόση, εφόσον αυτό δεν επηρεάζει αρνητικά τον σκοπό της δοκιμής.».

10. Λεπτομερής καθοδήγηση σχετικά με τις αρχές επιλογής δόσεων για μελέτες χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας και ανάλυση των αρχών αυτών περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (6), καθώς και σε δύο δημοσιεύσεις του International Life Sciences Institute (17) (18). Η βασική στρατηγική επιλογής των δόσεων εξαρτάται από τον πρωταρχικό στόχο (ή τους πρωταρχικούς στόχους) της μελέτης (παράγραφος 6). Κατά την επιλογή κατάλληλων επιπέδων δόσης θα πρέπει να επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ του ελέγχου των κινδύνων αφενός και του χαρακτηρισμού των αντιδράσεων που προκαλούν οι χαμηλές δόσεις και της καταλληλότητάς τους αφετέρου. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό στην περίπτωση που πρόκειται να διεξαχθεί συνδυασμένη μελέτη χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.33 του παρόντος παραρτήματος) (παράγραφος 11).

11. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.33 του παρόντος παραρτήματος) αντί μιας μελέτης χρόνιας τοξικότητας (η παρούσα μέθοδος δοκιμών B.30) και μιας μελέτης καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.32 του παρόντος παραρτήματος). Η συνδυασμένη δοκιμή προσφέρει μεγαλύτερη αποδοτικότητα ως προς τον χρόνο και το κόστος σε σύγκριση με τη διεξαγωγή δύο χωριστών μελετών, χωρίς να τίθεται σε κίνδυνο η ποιότητα των δεδομένων ούτε στη φάση χρόνιας τοξικότητας ούτε στη φάση καρκινογενετικότητας. Ωστόσο, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στις αρχές επιλογής των δόσεων (παράγραφοι 9 και 20-25) κατά τη διεξαγωγή συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.33 του παρόντος παραρτήματος), ενώ είναι γνωστό επίσης ότι ενδέχεται να απαιτούνται χωριστές μελέτες βάσει ορισμένων κανονιστικών πλαισίων.

12. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο καθοδήγησης GD 116 (6).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

13. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά σε διαβαθμισμένες δόσεις σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων, τυπικά για μια περίοδο 12 μηνών, παρόλο που είναι δυνατόν να επιλεγούν μεγαλύτερες ή μικρότερες περίοδοι ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις (βλέπε παράγραφο 33). Η διάρκεια αυτή επιλέγεται να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να επιτρέπεται η εκδήλωση τυχόν επιδράσεων σωρευτικής τοξικότητας, χωρίς να προκαλείται σύγχυση από τυχόν αλλαγές οφειλόμενες στη γήρανση. Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιαδήποτε απόκλιση από τη διάρκεια έκθεσης των 12 μηνών, ιδίως στην περίπτωση βραχύτερων περιόδων. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα, αν και μπορεί να είναι επίσης κατάλληλη η δοκιμή μέσω της αναπνευστικής οδού ή του δέρματος. Ο σχεδιασμός της μελέτης μπορεί να περιλαμβάνει επίσης μία ή περισσότερες ενδιάμεσες θανατώσεις, π.χ. κατά τον 3ο και τον 6ο μήνα, και πρόσθετες ομάδες ζώων για τον σκοπό αυτό (βλέπε παράγραφο 19). Τα ζώα εξετάζονται με προσοχή κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης για τη διαπίστωση τοξικών συμπτωμάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής νεκροτομούνται, και στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

▼M4

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

14. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών καλύπτει κυρίως την εκτίμηση και την αξιολόγηση της χρόνιας τοξικότητας σε τρωκτικά (βλέπε παράγραφο 2), αν και είναι γνωστό ότι ενδέχεται να απαιτείται η διεξαγωγή παρόμοιων μελετών σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, βάσει ορισμένων κανονιστικών καθεστώτων. Η επιλογή του είδους πρέπει να αιτιολογείται. Ο σχεδιασμός και η διεξαγωγή των μελετών χρόνιας τοξικότητας σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, όταν απαιτούνται τέτοιες μελέτες, θα πρέπει να βασίζονται στις αρχές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, καθώς και στις αρχές του κεφαλαίου Β.27 «Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά» του παρόντος παραρτήματος (5). Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή είδους και φυλής παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (6).

15. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, το προτιμότερο είδος είναι ο επίμυς αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα είδη τρωκτικών, π.χ. ποντικοί. Οι επίμυες και οι ποντικοί είναι προτιμώμενα πειραματικά μοντέλα, λόγω της σχετικά μικρής διάρκειας ζωής τους, της εκτεταμένης χρήσης τους σε φαρμακολογικές και τοξικολογικές μελέτες, της ευαισθησίας τους στην ογκογένεση και της διαθεσιμότητας καταλλήλως χαρακτηρισμένων φυλών. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, υπάρχουν διαθέσιμες πολλές πληροφορίες για τη φυσιολογία και την παθολογία τους. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Η μελέτη χρόνιας τοξικότητας θα πρέπει να διεξάγεται σε ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν σε προκαταρκτικές μελέτες τοξικότητας βραχύτερης διάρκειας. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

16. Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται σε ατομικό κλωβό ή σε κλωβούς σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου· τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά μόνο εάν αυτό αιτιολογείται επιστημονικά. Οι κλωβοί διευθετούνται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι οφειλόμενες στη θέση των κλωβών επιδράσεις. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Παρόλο που η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, παρά μόνο κατά τη διάρκεια του καθαρισμού της αίθουσας, τα επιδιωκόμενα επίπεδα της υγρασίας θα πρέπει να είναι 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος να αποτελείται από δώδεκα ώρες φωτός και δώδεκα ώρες σκότους. Όσον αφορά τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με παροχή απεριόριστου πόσιμου νερού. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να ανταποκρίνεται σε όλες τις διατροφικές απαιτήσεις των ειδών που υποβάλλονται στη δοκιμή και η περιεκτικότητα σε τροφικές προσμείξεις, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, υπολειμμάτων ζιζανιοκτόνων, ανθεκτικών οργανικών ρύπων, φυτοοιστρογόνων, βαρέων μετάλλων και μυκοτοξινών, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της δοκιμής, θα πρέπει να είναι όσον το δυνατόν μικρότερη. Αναλυτικές πληροφορίες για τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών και τροφικών προσμείξεων θα πρέπει να παρέχονται σε περιοδική βάση, τουλάχιστον στην αρχή της μελέτης και όταν υπάρχει αλλαγή στη χρησιμοποιούμενη παρτίδα και θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση. Θα πρέπει αντίστοιχα να παρέχονται αναλυτικές πληροφορίες για το πόσιμο νερό που χρησιμοποιείται στη μελέτη. Η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη διασφάλισης κατάλληλης πρόσμειξης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και κάλυψης των διατροφικών απαιτήσεων των ζώων, όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μαζί με την τροφή.

Προετοιμασία των ζώων

17. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα, εγκλιματισμένα στις εργαστηριακές συνθήκες για τουλάχιστον 7 ημέρες, τα οποία δεν έχουν υποβληθεί σε άλλες πειραματικές διαδικασίες στο παρελθόν. Στην περίπτωση τρωκτικών, η χορήγηση δόσεων στα ζώα θα πρέπει να ξεκινήσει το συντομότερο δυνατό μετά τον απογαλακτισμό και τον εγκλιματισμό και, κατά προτίμηση, πριν από την ηλικία των 8 εβδομάδων. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να είναι χαρακτηρισμένα ως προς το είδος, τη φυλή, την προέλευση, το φύλο, το

▼M4

βάρος και την ηλικία τους. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων σε κάθε φύλο θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους όλων των ζώων της μελέτης, χωριστά για κάθε φύλο. Τα ζώα πρέπει να κατανέμονται τυχαία σε ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Μετά την τυχαία κατανομή, δεν πρέπει να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο μέσο σωματικό βάρος μεταξύ των ομάδων σε κάθε φύλο. Εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, εάν είναι δυνατό, το στάδιο της τυχαίας κατανομής. Κάθε ζώο πρέπει να λαμβάνει έναν μοναδικό αριθμό αναγνώρισης και να φέρει μόνιμη σήμανση με τον αριθμό αυτό μέσω δερματοστηξίας, εμφυτεύματος μικροτσίπ ή άλλης κατάλληλης μεθόδου.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

18. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα και των δύο φύλων. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκής αριθμός ζώων έτσι ώστε στο τέλος της μελέτης να υπάρχουν αρκετά ζώα διαθέσιμα σε κάθε ομάδα για ενδελεχή βιολογική και στατιστική αξιολόγηση. Στην περίπτωση τρωκτικών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνήθως τουλάχιστον 20 ζώα ανά φύλο ανά ομάδα σε κάθε επίπεδο δόσης, ενώ εάν χρησιμοποιούνται άλλα ζώα εκτός τρωκτικών, συνιστάται να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 4 ζώα ανά φύλο ανά ομάδα. Σε μελέτες με ποντικούς, ενδέχεται να απαιτούνται επιπλέον ζώα σε κάθε ομάδα δόσης για τη διεξαγωγή όλων των απαιτούμενων αιματολογικών εξετάσεων.

Πρόβλεψη για ενδιάμεσες θανατώσεις, δορυφορικές ομάδες και ζώα-φρουρούς

19. Η μελέτη ενδέχεται να προβλέπει ενδιάμεσες θανατώσεις (τουλάχιστον 10 ζώα/φύλο/ομάδα), π.χ. τον 6ο μήνα, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την εξέλιξη των τοξικολογικών αλλαγών και μηχανιστικών πληροφοριών, εφόσον αυτό αιτιολογείται επιστημονικά. Στην περίπτωση που οι πληροφορίες αυτές είναι ήδη διαθέσιμες από προηγούμενες μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση σχετικά με την ελεγχόμενη χημική ουσία, οι ενδιάμεσες θανατώσεις ενδέχεται να μην δικαιολογούνται επιστημονικά. Είναι επίσης δυνατόν να συμπεριλαμβάνονται δορυφορικές ομάδες ώστε να παρακολουθείται η αναστρεψιμότητα τυχόν τοξικολογικών αλλαγών που προκαλεί η ελεγχόμενη χημική ουσία. Οι ομάδες αυτές περιορίζονται συνήθως στο επίπεδο μέγιστης δόσης της μελέτης συν τους μάρτυρες. Είναι επίσης δυνατόν να συμπεριλαμβάνεται μια πρόσθετη ομάδα ζώων-φρουρών (συνήθως 5 ζώα ανά φύλο) για την παρακολούθηση της κατάστασης ασθενείας, εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης (22). Εάν έχουν σχεδιαστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων ή συμμετοχή δορυφορικών ομάδων ή ομάδων ζώων-φρουρών, ο αριθμός των ζώων που προβλέπει ο σχεδιασμός της μελέτης πρέπει να αυξηθεί κατά τον αριθμό των ζώων που έχει προγραμματιστεί να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Τα ζώα αυτά θα πρέπει να υποβάλλονται κανονικά στις ίδιες παρατηρήσεις σχετικά, μεταξύ άλλων, με το σωματικό βάρος τους, την κατανάλωση τροφής/νερού, αιματολογικές μετρήσεις και μετρήσεις κλινικής βιοχημείας και παθολογικές εξετάσεις με αυτές στις οποίες υποβάλλονται τα ζώα στη φάση χρόνιας τοξικότητας της κυρίως μελέτης. Ωστόσο, ενδέχεται να γίνεται πρόβλεψη (στις ομάδες ενδιάμεσης θανάτωσης) για τον περιορισμό των μετρήσεων σε συγκεκριμένες, βασικές μετρήσεις, όπως σχετικά με τη νευροτοξικότητα ή την ανοσοτοξικότητα.

Ομάδες δόσεων και δοσολογία

20. Κατευθύνσεις για όλα τα ζητήματα που αφορούν την επιλογή των δόσεων και το διάστημα που πρέπει να παρεμβάλλεται μεταξύ των δόσεων περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (6). Χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον διαφορετικές δόσεις και ένας μάρτυρας, πλην των περιπτώσεων όπου εκτελείται οριακή δοκιμή (βλέπε παράγραφο 27). Τα επίπεδα δόσης θα βασίζονται γενικά στα αποτελέσματα πιο βραχυχρόνιων μελετών με επαναλαμβανόμενη δόση ή μελετών καθορισμού εύρους και θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τυχόν υφιστάμενα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που είναι διαθέσιμα για την ελεγχόμενη χημική ουσία ή για σχετικές χημικές ουσίες.

▼M4

21. Θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως το μέγιστο επίπεδο δόσης για τον προσδιορισμό των κυρίων οργάνων-στόχου και τοξικών επιδράσεων, χωρίς να προκαλείται πόνος, σοβαρή τοξικότητα, νοσηρότητα ή θάνατος, εκτός εάν οι φυσικοχημικές ιδιότητες και οι βιολογικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θέτουν περιορισμούς. Λαμβάνοντας παράλληλα υπόψη τους παράγοντες που περιγράφονται στην παράγραφο 22 κατωτέρω, το επίπεδο μέγιστης δόσης θα πρέπει να επιλέγεται έτσι ώστε να προκαλεί αποδεδειγμένη τοξικότητα, όπως αυτή μαρτυρείται, παραδείγματος χάριν, από τη μείωση της αύξησης του σωματικού βάρους (κατά περίπου 10 %).

22. Ωστόσο, ανάλογα με τους στόχους της μελέτης (βλέπε παράγραφο 6), ενδέχεται να επιλέγεται ένα ανώτατο επίπεδο δόσης χαμηλότερο από τη δόση που παρέχει αποδεικτικά στοιχεία τοξικότητας, π.χ. εάν μια δόση προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις που προκαλούν προβληματισμό αλλά που επηρεάζουν ελάχιστα τη διάρκεια ζωής ή το βάρος του σώματος. Η ανώτατη δόση δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα (οριακή δόση, βλέπε παράγραφο 27).

23. Ενδέχεται να επιλέγονται επίπεδα δόσης και χρονικά διαστήματα μεταξύ των δόσεων ώστε να προσδιορίζεται σχέση δόσης-απόκρισης και επίπεδο NOAEL ή άλλο επιδιωκόμενο αποτέλεσμα της μελέτης, π.χ. δόση αναφοράς (BMD) (βλέπε παράγραφο 25) στο ελάχιστο επίπεδο δόσης. Παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον προσδιορισμό των χαμηλότερων δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, η αναμενόμενη κλίση της καμπύλης δόσης-απόκρισης, οι δόσεις στις οποίες ενδέχεται να προκαλούνται σημαντικές αλλαγές στον μεταβολισμό ή στον τρόπο τοξικής δράσης ή οι οποίες αναμένεται να είναι το κατώτατο όριο ή η αφετηρία για παρέκταση σε χαμηλές δόσεις.

24. Το επιλεγόμενο διάστημα μεταξύ των δόσεων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και δεν μπορεί να προβλεφθεί στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, αλλά υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα εξασφαλίζουν συχνά καλές επιδόσεις στη δοκιμή όταν χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό μειούμενων επιπέδων δόσης και η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συνήθως προτιμότερη της χρήσης πολύ μεγάλων διαστημάτων (π.χ. μεγαλύτερων ενός συντελεστή της τάξης του 6-10) μεταξύ των δόσεων. Γενικά θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση συντελεστών μεγαλύτερων του 10, ενώ, όταν χρησιμοποιούνται τέτοιοι συντελεστές, η χρήση τους θα πρέπει να αιτιολογείται.

25. Όπως περιγράφεται περαιτέρω στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (6), τα σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, τα εξής:

— σημεία μη γραμμικότητας ή σημεία κλίσης στην καμπύλη δόσης-απόκρισης που είναι γνωστά ή για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ύπαρξης,

— τοξικοκινητική και ρύθμιση της δοσολογίας, στην περίπτωση που λαμβάνει ή δεν λαμβάνει χώρα μεταβολική επαγωγή, κορεσμός ή μη γραμμικότητα μεταξύ εξωτερικων και εσωτερικών δόσεων,

— πρόδρομες αλλοιώσεις, δείκτες επίδρασης ή δείκτες της λειτουργίας βασικών υποκείμενων βιολογικών διεργασιών,

— βασικές (ή πιθανολογούμενες) πτυχές του τρόπου δράσης, όπως δόσεις στις οποίες αρχίζει να εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα, διαταράσσονται τα επίπεδα ορμονών, καταβάλλονται οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί κ.λπ.,

— περιοχές στην καμπύλη δόσης-απόκρισης στις οποίες απαιτείται μια ιδιαιτέρως αξιόπιστη εκτίμηση, π.χ. στο πεδίο τιμών της αναμενόμενης δόσης αναφοράς ή ενός πιθανολογούμενου κατώτατου ορίου,

— εκτίμηση των αναμενόμενων επιπέδων έκθεσης του ανθρώπου.

▼M4

26. Οι μάρτυρες είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα προοριζόμενη για τον έλεγχο του φορέα, εφόσον χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Με εξαίρεση τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση με τα ζώα της ομάδας αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται φορέας, ο όγκος φορέα που χορηγείται στους μάρτυρες είναι ο μεγαλύτερος που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής. Εάν μια ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή και προκαλεί σημαντικά μειωμένη πρόσληψη τροφής λόγω μειωμένης γευστικότητας του σιτηρεσίου, τότε ίσως είναι χρήσιμη ως καταλληλότερος μάρτυρας μια επιπλέον ομάδα- μάρτυρας στην οποία χορηγείται το ίδιο σιτηρέσιο.

27. Εάν αναμένεται, βάσει πληροφοριών από προκαταρκτικές μελέτες, ότι μια δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης, ισοδύναμης με τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, εφαρμόζοντας τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη, δεν είναι πιθανό να προκαλέσει δυσμενείς επιδράσεις και εάν δεν αναμένεται πρόκληση τοξικότητας βάσει δεδομένων σχετικά με χημικές ουσίες ανάλογης δομής, είναι δυνατόν να μην απαιτείται διεξαγωγή πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσεων. Μπορεί να εφαρμόζεται όριο 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, εκτός εάν από την έκθεση του ανθρώπου προκύψει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλοτέρου επίπεδου δόσης.

Παρασκευή των δόσεων και χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

28. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα, με την τροφή ή το πόσιμο νερό ή με καθετήρα. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδών και μεθόδων χορήγησης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (6). Η οδός και η μέθοδος χορήγησης εξαρτώνται από τον σκοπό της μελέτης, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τη βιοδιαθεσιμότητά της και την κύρια οδό και μέθοδο έκθεσης του ανθρώπου. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή οδού και μεθόδου χορήγησης. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, η χορήγηση μέσω της στοματικής οδού με καθετήρα θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως μόνο για τους παράγοντες για τους οποίους η συγκεκριμένη οδός και μέθοδος χορήγησης αναμένεται εύλογα να αποτελούν ενδεχόμενο τρόπο έκθεσης του ανθρώπου (π.χ. φαρμακευτικές ουσίες). Διατροφικές ή περιβαλλοντικές χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανιοκτόνων, χορηγούνται συνήθως με την τροφή ή το πόσιμο νερό. Ωστόσο, βάσει ορισμένων σεναρίων, π.χ. έκθεση κατά την εργασία, ενδέχεται να είναι καταλληλότερη η χορήγηση μέσω άλλων οδών.

29. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του φορέα και άλλων προσθέτων, όπου χρησιμοποιούνται: επιδράσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στον μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, επιδράσεις στις χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, ως πρώτη επιλογή, διαλύματος/γαλακτώματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) κατόπιν, και, ως τελευταία επιλογή, η χρήση διαλύματος σε άλλο φορέα. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, τα τοξικά χαρακτηριστικά του φορέα πρέπει να είναι γνωστά. Πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τη σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την ομοιογένεια των διαλυμάτων ή σιτηρεσίων δόσης (κατά περίπτωση) στις συνθήκες χορήγησης (π.χ. στο σιτηρέσιο).

30. Για τις χημικές ουσίες που χορηγούνται με την τροφή ή το πόσιμο νερό πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες ελεγχόμενης χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Σε μελέτες μακροπρόθεσμης τοξικότητας με χορήγηση με την τροφή, η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά ένα ανώτατο όριο 5 % του συνολικού σιτηρεσίου, ώστε να αποφεύγονται διατροφικές ανισορροπίες. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, πρέπει να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (mg/kg σιτηρεσίου ή ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος του ζώου (mg/kg βάρους σώματος), υπολογιζόμενο σε εβδομαδιαία βάση. Η χρησιμοποιούμενη εναλλακτική επιλογή πρέπει να διευκρινίζεται.

▼M4

31. Στην περίπτωση χορήγησης από το στόμα, χορηγούνται στα ζώα δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθημερινά (επτά ημέρες την εβδομάδα), συνήθως για περίοδο 12 μηνών (βλέπε επίσης παράγραφο 33), αν και ενδέχεται να απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις. Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιοδήποτε άλλο καθεστώς δοσολογίας που τυχόν χρησιμοποιείται, π.χ. χορήγηση πέντε ημέρες την εβδομάδα. Στην περίπτωση χορήγησης μέσω του δέρματος, τα ζώα εκτίθενται κανονικά στην ελεγχόμενη χημική ουσία για τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, όπως προσδιορίζεται στο κεφάλαιο Β.9 του παρόντος παραρτήματος (10), για μια περίοδο 12 μηνών. Έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού πραγματοποιείται 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, αλλά ενδέχεται να εφαρμόζεται επίσης έκθεση για 5 ημέρες την εβδομάδα, εφόσον παρέχεται σχετική αιτιολόγηση. Η περίοδος έκθεσης διαρκεί συνήθως 12 μήνες. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Θα πρέπει να παρέχεται αιτιολόγηση στην περίπτωση που εφαρμόζεται διάρκεια έκθεσης μικρότερη των 6 ωρών ημερησίως. Βλέπε επίσης κεφάλαιο Β.8 του παρόντος παραρτήματος (8).

32. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα στα ζώα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται με τη βοήθεια καθετήρα στομάχου ή κατάλληλης διασωλήνωσης, την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα. Συνήθως χορηγείται μία δόση μία φορά την ημέρα, ενώ, στην περίπτωση που μια χημική ουσία έχει τοπική ερεθιστική δράση, μπορεί να διατηρείται η ημερήσια δοσολογία με τη χορήγηση μισών δόσεων (δύο φορές την ημέρα). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος θα πρέπει να διατηρείται στο ελάχιστο εφικτό επίπεδο και δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά το 1 ml / 100 g βάρους σώματος, στην περίπτωση των τρωκτικών (22). Οι διαφορές του όγκου πρέπει να ελαχιστοποιούνται ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης. Εξαίρεση αποτελούν οι ενδεχομένως διαβρωτικές ή ερεθιστικές χημικές ουσίες, οι οποίες θα πρέπει να αραιώνονται ώστε να αποφεύγονται οι σοβαρές τοπικές επιδράσεις. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διεξαγωγή δοκιμών σε συγκεντρώσεις που πιθανόν να αποδειχθούν διαβρωτικές ή ερεθιστικές για το γαστρεντερικό σύστημα.

Διάρκεια της μελέτης

33. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί κυρίως ως μελέτη χρόνιας τοξικότητας με διάρκεια 12 μηνών. Ωστόσο, ο σχεδιασμός της μελέτης επιτρέπει επίσης την εφαρμογή της ως μελέτη είτε μικρότερης διάρκειας (π.χ. για 6 ή 9 μήνες) είτε μεγαλύτερης (π.χ. για 18 ή 24 μήνες), ανάλογα με τις απαιτήσεις συγκεκριμένων ρυθμιστικών καθεστώτων ή για συγκεκριμένους μηχανιστικούς σκοπούς. Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιαδήποτε απόκλιση από τη διάρκεια έκθεσης των 12 μηνών, ιδίως στην περίπτωση βραχύτερων περιόδων. Στις δορυφορικές ομάδες που περιλαμβάνονται στη μελέτη, για την παρακολούθηση της αναστρεψιμότητας τυχόν τοξικολογικών αλλαγών προκαλούμενων από την ελεγχόμενη χημική ουσία, θα πρέπει να μην χορηγούνται δόσεις για περίοδο τουλάχιστον 4 εβδομάδων, η οποία, ωστόσο, δεν μπορεί να υπερβαίνει το ένα τρίτο της συνολικής διάρκειας της μελέτης μετά την παύση της έκθεσης. Περαιτέρω κατευθύνσεις, συμπεριλαμβανομένων ζητημάτων σχετικών με την επιβίωση των ζώων στη μελέτη, περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (6).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

34. Θα πρέπει να ελέγχονται όλα τα ζώα, συνήθως στην αρχή και το τέλος κάθε ημέρας, καθώς και τα Σαββατοκύριακα και τις αργίες, ώστε να διαπιστώνεται τυχόν νοσηρότητα ή θνησιμότητά τους. Γενικές κλινικές παρατηρήσεις πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον μια φορά την ημέρα, κατά προτίμηση την (τις) ίδια(-ες) ώρα(-ες) κάθε μέρα και λαμβάνοντας υπόψη τον χρόνο κορυφώσεως των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης, στην περίπτωση χορήγησης με καθετήρα.

▼M4

35. Όλα τα ζώα πρέπει να υποβληθούν σε λεπτομερή κλινική παρατήρηση τουλάχιστον μία φορά πριν από την πρώτη έκθεση (προκειμένου να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ζώων), στο τέλος της πρώτης εβδομάδας της μελέτης και, στη συνέχεια, σε μηνιαία βάση. Το πρωτόκολλο παρατήρησης θα πρέπει να είναι καθορισμένο έτσι ώστε οι αποκλίσεις μεταξύ των επιμέρους προσώπων που διενεργούν την παρατήρηση να είναι ελάχιστες και ανεξάρτητες της ομάδας αγωγής. Οι παρατηρήσεις αυτές πρέπει να διενεργούνται έξω από τους κλωβούς, κατά προτίμηση σ' έναν τυποποιημένο χώρο και σε διάφορες χρονικές στιγμές σε κάθε περίπτωση. Καταγράφονται προσεκτικά, κατά προτίμηση με συστήματα βαθμολόγησης καθορισμένα σαφώς από το εργαστήριο. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να είναι ελάχιστες οι διαφορές στις συνθήκες παρατήρησης. Καταγράφονται, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα, στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς, στους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις καθώς και αυτόνομες ενέργειες (όπως δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή της διαμέτρου της κόρης του οφθαλμού και του ρυθμού της αναπνοής). Καταγράφονται επίσης μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση και στην αντίδραση κατά τη μεταχείριση, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση του εαυτού τους, συνεχείς περιστροφές) ή περίεργης συμπεριφοράς (όπως αυτοακρωτηριασμός, βάδισμα προς τα πίσω) (24).

36. Η οφθαλμολογική εξέταση, με χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται σε όλα τα ζώα πριν από την πρώτη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στο τέλος της μελέτης, η εξέταση πρέπει να διενεργείται, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς που σχετίζονται με την αγωγή, πρέπει να εξετάζονται όλα τα ζώα. Εάν η ανάλυση της δομής ή άλλες πληροφορίες καταδεικνύουν πρόκληση οφθαλμικής τοξικότητας, θα πρέπει να αυξηθεί η συχνότητα της οφθαλμικής εξέτασης.

37. Στην περίπτωση χημικών ουσιών οι οποίες, βάσει προηγούμενων μελετών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση, μπορούν να προκαλέσουν νευροτοξικές επιδράσεις, μπορούν να διενεργούνται προαιρετικά, πριν από την έναρξη της μελέτης και, μετά την έναρξη, ανά 3 μήνες έως και τη συμπλήρωση 12 μηνών, καθώς και στο τέλος της μελέτης (εάν η μελέτη διαρκεί περισσότερο από 12 μήνες), αξιολόγηση της αισθητηριακής αντίδρασης σε διαφορετικών ειδών ερεθίσματα (24) (π.χ. ακουστικά, οπτικά και ιδιοδεκτικά) (25), (26), (27), αξιολόγηση της δύναμης λαβής (28) και αξιολόγηση της μυϊκής δραστηριότητας (29). Λεπτομέρειες σχετικά με τις διαδικασίες που μπορούν να ακολουθηθούν παρέχονται στις σχετικές βιβλιογραφικές παραπομπές. Ωστόσο, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και άλλες διαδικασίες αντί των αναφερόμενων στις παραπομπές.

38. Στην περίπτωση χημικών ουσιών οι οποίες, βάσει προηγούμενων μελετών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση, μπορούν να προκαλέσουν ανοσοτοξικές επιδράσεις, ενδέχεται να διενεργούνται προαιρετικά περαιτέρω έρευνες για το συγκεκριμένο καταληκτικό σημείο στο τέλος της μελέτης.

Βάρος σώματος, κατανάλωση τροφής και νερού και απόδοση της τροφής

39. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της αγωγής, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση τροφής και η απόδοση της τροφής θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια, στην περίπτωση που η χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού. Μετρήσεις της κατανάλωσης ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη στις μελέτες κατά τις οποίες η δραστηριότητα πόσης μπορεί να μεταβληθεί.

▼M4

Αιματολογικές εξετάσεις και κλινική βιοχημεία

40. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν τρωκτικά, πρέπει να διενεργούνται αιματολογικές εξετάσεις σε τουλάχιστον 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα, κατά τον 3ο, τον 6ο και το 12ο μήνα, καθώς και στο τέλος της μελέτης (αν διαρκεί περισσότερο από 12 μήνες), με τη χρήση των ίδιων ζώων σε όλες τις εξετάσεις. Στην περίπτωση χρήσης ποντικών, ενδέχεται να απαιτούνται δορυφορικά ζώα για τη διενέργεια όλων των απαιτούμενων αιματολογικών εξετάσεων (βλέπε παράγραφο 18). Σε μελέτες που διεξάγονται σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, λαμβάνονται δείγματα από μικρότερο αριθμό ζώων (π.χ. 4 ζώα ανά φύλο και ανά ομάδα, στην περίπτωση μελετών σε σκύλους), σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας και στο τέλος της μελέτης, όπως προβλέπεται και για τα τρωκτικά. Ενδέχεται να μη χρειάζονται μετρήσεις τον 3ο μήνα, είτε σε τρωκτικά είτε σε άλλα είδη, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις αιματολογικές παραμέτρους σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο, π.χ. με καρδιακή παρακέντηση ή από τον οφθαλμικό κόγχο, οπισθοβολβικά, υπό αναισθησία.

41. Θα πρέπει να εξετάζονται οι ακόλουθες παράμετροι (30): Συνολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων και διαφορικός λευκοκυτταρικός τύπος, αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, αριθμός αιμοπεταλίων, αιματοκρίτης (HCT), μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων (MCV), μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (MCH), μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης (MCHC), χρόνος προθρομβίνης και ενεργός μερικός χρόνος θρομβοπλαστίνης. Άλλες αιματολογικές παράμετροι, όπως τα σωμάτια Heinz ή άλλη άτυπη μορφολογία ερυθρών αιμοσφαιρίων ή μεθαιμοσφαιρίνης ενδέχεται να μετρώνται κατά περίπτωση, ανάλογα με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Θα πρέπει να επιλεγεί συνολικά μια ευέλικτη προσέγγιση, ανάλογα με τις παρατηρούμενες και/ή αναμενόμενες επιδράσεις μιας δεδομένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία επηρεάζει το αιμοποιητικό σύστημα, ενδέχεται να ενδείκνυται εξέταση του αριθμού των δικτυοερυθροκυττάρων και της κυτταρολογίας του μυελού των οστών, αν και οι εξετάσεις αυτές δεν χρειάζεται να διενεργούνται συχνά.

42. Διενεργούνται βιοχημικές εξετάσεις για τη διερεύνηση κύριων τοξικών επιδράσεων στους ιστούς και, ειδικότερα, στους νεφρούς και στο ήπαρ, σε δείγματα αίματος που λαμβάνονται από τουλάχιστον 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα, κατά τα ίδια χρονικά διαστήματα που προβλέπονται για τις αιματολογικές εξετάσεις, με τη χρήση των ίδιων ζώων σε όλες τις εξετάσεις. Στην περίπτωση χρήσης ποντικών, ενδέχεται να απαιτούνται δορυφορικά ζώα για τη διενέργεια όλων των απαιτούμενων εξετάσεων κλινικής βιοχημείας. Σε μελέτες που διεξάγονται σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, λαμβάνονται δείγματα από μικρότερο αριθμό ζώων (π.χ. 4 ζώα ανά φύλο και ανά ομάδα, στην περίπτωση μελετών σε σκύλους), σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας και στο τέλος της μελέτης, όπως προβλέπεται και για τα τρωκτικά. Ενδέχεται να μη χρειάζονται μετρήσεις τον 3ο μήνα, είτε σε τρωκτικά είτε σε άλλα είδη, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις βιοχημικές παραμέτρους σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Συνιστάται να παραμένουν νηστικά τα ζώα (με την εξαίρεση των ποντικών) τη νύχτα που προηγείται της αιμοληψίας. Θα πρέπει να εξετάζονται οι ακόλουθες παράμετροι (30): γλυκόζη, ουρία (άζωτο ουρίας), κρεατινίνη, ολικές πρωτεΐνες, αλβουμίνη, ασβέστιο, νάτριο, κάλιο, ολική χοληστερόλη, τουλάχιστον δύο κατάλληλες εξετάσεις για την αξιολόγηση της ηπατοκυτταρικής επίδρασης (αλανινο-αμινοτρανσφεράση, ασπαραγινική αμινοτρασφεράση, γλουταμική αφυδρογονάση, ολικά χολικά οξέα) (31) και τουλάχιστον δύο κατάλληλες εξετάσεις για την αξιολόγηση της επίδρασης στο ηπατοχολικό σύστημα (αλκαλική φωσφατάση, γ-γλουταμυλοτρανσφεράση, 5-νουκλεοτιδάση, ολική χολερυθρίνη, ολικά χολικά οξέα) (31). Μπορούν να μετρώνται, κατά περίπτωση, άλλες παράμετροι κλινικής χημείας, όπως τα τριγλυκερίδια μετά από νηστεία, ειδικές ορμόνες και η χολινεστεράση, ανάλογα με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Γενικά πρέπει να ακολουθείται ευέλικτη προσέγγιση, ανάλογα με τις παρατηρούμενες και/ή αναμενόμενες επιδράσεις από μια συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία.

▼M4

43. Θα πρέπει να διενεργούνται αναλύσεις ούρων σε τουλάχιστον 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα σε δείγματα που συλλέγονται κατά τα ίδια διαστήματα με αυτά που προβλέπονται για τις αιματολογικές εξετάσεις και τις εξετάσεις κλινικής χημείας. Ενδέχεται να μη χρειάζονται μετρήσεις τον 3ο μήνα, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις αναλύσεις ούρων σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Οι ακόλουθες παράμετροι περιλαμβάνονται σε μια σύσταση εμπειρογνωμόνων για τις μελέτες κλινικής παθολογίας (30): όψη, όγκος, οσμωτική ικανότητα ή ειδικό βάρος, pH, ολικές πρωτεΐνες και γλυκόζη. Άλλες εξετάσεις περιλαμβάνουν την κετόνη, το ουροχολιγόνο, τη χολερυθρίνη και τη μικροσκοπική αιμορραγία. Πρόσθετες παράμετροι μπορεί να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχει ανάγκη επέκτασης της έρευνας των παρατηρηθεισών επιδράσεων.

44. Γενικά θεωρείται ότι απαιτείται προσδιορισμός αιματολογικών και κλινικών βιοχημικών μεταβλητών αναφοράς πριν από μελέτες αγωγής σε σκύλους, αλλά όχι πριν από μελέτες σε τρωκτικά (30). Ωστόσο, εάν τα ιστορικά δεδομένα αναφοράς (βλέπε παράγραφο 50) δεν είναι κατάλληλα, εξετάζεται κατά πόσον θα πρέπει να προσδιοριστούν τα δεδομένα αυτά.

Παθολογοανατομία

Νεκροψία

45. Όλα τα ζώα της μελέτης πρέπει κανονικά να υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ωστόσο, ενδέχεται να προβλέπεται (στις ομάδες ενδιάμεσης θανάτωσης ή στις δορυφορικές ομάδες) περιορισμός των μετρήσεων αυτών σε συγκεκριμένες βασικές μετρήσεις σχετικά, παραδείγματος χάριν, με τη νευροτοξικότητα ή την ανοσοτοξικότητα (βλέπε παράγραφο 19). Δεν απαιτείται νεκροψία και διεξαγωγή των επακόλουθων διαδικασιών που περιγράφονται στις επόμενες παραγράφους στα ζώα αυτά. Ενδέχεται να απαιτείται νεκροψία στα ζώα φρουρούς κατά περίπτωση, επαφιέμενη στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης.

46. Θα πρέπει να μετράται το βάρος των οργάνων όλων των ζωών, εκτός αυτών που εξαιρούνται βάσει του τελευταίου μέρους της παραγράφου 45. Τα επινεφρίδια, ο εγκέφαλος, οι επιδιδυμίδες, η καρδιά, οι νεφροί, το ήπαρ, οι ωοθήκες, η σπλήνα, οι όρχεις, ο θυρεοειδής (ζυγίζεται μετά τη μονιμοποίηση μαζί με τους παραθυρεοειδείς) και η μήτρα όλων των ζώων (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα και/ή όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει) καθαρίζονται από τυχόν άλλους προσκολλημένους ιστούς, όπως ενδείκνυται, και ζυγίζονται υγρά αμέσως μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση. Σε μελέτες που χρησιμοποιούνται ποντικοί, η ζύγιση των επινεφριδίων είναι προαιρετική.

47. Οι ακόλουθοι ιστοί πρέπει διατηρούνται στο καταλληλότερο μονιμοποιητικό υλικό, τόσο για τον τύπο ιστού όσο και για την ιστοπαθολογική εξέταση που πρόκειται να ακολουθήσει (32) (οι ιστοί που αναφέρονται εντός αγκύλων διατηρούνται προαιρετικά):

όλες οι μακροσκοπικές βλάβες	καρδιά	πάγκρεας	στόμαχος (προστόμαχος, αδενικό τμήμα στομάχου)
επινεφρίδιος αδένας	ειλεός	παραθυρεοειδής αδένας	[δόντια]
αορτή	νήστις	περιφερειακό νεύρο	όρχις
εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	νεφρός	υπόφυση	θύμος αδένας
τυφλό έντερο	δακρυγόνος αδένας (εξωβολβικός)	προστάτης	θυρεοειδής
τράχηλος της μήτρας	ήπαρ	ορθό	[γλώσσα]

▼**M4**

πηκτικός αδένας	πνεύμονας	σιελογόνος αδένας	τραχεία
κόλον	λεμφαδένες (επιπολής και εν τω βάθει)	σπερματοδόχος κύστη	ουροδόχος κύστη
δωδεκαδάκτυλο	μαστικός αδένας (υποχρεωτικά για θηλυκά ζώα και, εάν μπορεί ορατά να ανατμηθεί, από αρσενικά ζώα)	σκελετικός μυς	μήτρα (συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου)
επιδιδυμίδα	[ανώτερη αναπνευστική οδός, συμπεριλαμβανομένης της μύτης, των κογχών και των παραρρινίων κόλπων]	δέρμα	[ουρητήρας]
οφθαλμός (συμπεριλαμβανομένου του αμφιβληστροειδή)	οισοφάγος	νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)	[ουρήθρα]
[μηριαίο οστό μαζί με την άρθρωση]	[οσφρητικός βολβός]	σπλήνα	κόλπος
χοληδόχος κύστη (για άλλα είδη εκτός του επίμυ)	ωοθήκη	[στέρνο]	τομή του μυελού των οστών και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών
αδένας του Harder			

Στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να διατηρούνται αμφότερα τα όργανα. Βάσει των κλινικών και άλλων ευρημάτων, ενδέχεται να πρέπει να εξεταστούν επιπρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν χορήγηση μέσω του δέρματος, θα πρέπει να διατηρούνται τα όργανα που αναφέρονται στον κατάλογο οργάνων που πρέπει να διατηρούνται στις μελέτες χορήγησης από το στόμα, ενώ απαιτείται επίσης ειδική δειγματοληψία και διατήρηση δέρματος από το σημείο έκθεσης. Στις αναπνευστικές μελέτες, ο κατάλογος των προς διατήρηση και εξέταση ιστών της αναπνευστικής οδού θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις συστάσεις των κεφαλαίων Β.8 (8) και Β.29 (9) του παρόντος παραρτήματος. Στην περίπτωση άλλων οργάνων/ιστών (επιπροσθέτως των συγκεκριμένων ιστών της αναπνευστικής οδού που πρέπει να διατηρούνται), θα πρέπει να εξετάζεται ο κατάλογος οργάνων που αναφέρεται στην περίπτωση μελετών έκθεσης μέσω του στόματος.

Ιστοπαθολογία

48. Διατίθεται καθοδήγηση σχετικά με τις βέλτιστες πρακτικές κατά τη διεξαγωγή μελετών τοξικολογικής παθολογίας (32). Ιστοπαθολογικές εξετάσεις πρέπει να διενεργούνται τουλάχιστον:

— σε όλους τους ιστούς της ομάδας υψηλής δόσης και της ομάδας των μαρτύρων,

— σε όλους τους ιστούς των ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης,

— σε όλους τους ιστούς που εμφανίζουν μακροσκοπικές ανωμαλίες,

— σε ιστούς-στόχο ή ιστούς που εμφάνισαν σχετικές με την αγωγή αλλαγές στην ομάδα υψηλής δόσης, από όλα τα ζώα σε όλες τις άλλες ομάδες δόσεων,

— στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να εξετάζονται αμφότερα τα όργανα.

▼M4

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Στοιχεία

49. Θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για όλες τις παραμέτρους που αξιολογήθηκαν για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, όλα τα στοιχεία πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα αγωγής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της αγωγής, τον αριθμό των ζώων που ευρέθησαν νεκρά κατά τη διάρκεια της αγωγής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν εκδηλώσεις τοξικότητας, περιγραφή των παρατηρηθέντων τοξικών συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισής τους, της διάρκειας και της σοβαρότητάς τους, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν αλλοιώσεις, το είδος των αλλοιώσεων και το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν καθέναν από τους τύπους αλλοιώσεων. Συνοπτικοί πίνακες στοιχείων θα πρέπει να αναφέρουν τις μέσες και τυπικές αποκλίσεις (όσον αφορά δεδομένα συνεχούς δοκιμής) που διαπιστώθηκαν σε ζώα που εμφάνισαν τοξικές επιδράσεις ή κακώσεις, καθώς και διαβάθμιση των κακώσεων.

50. Ιστορικά δεδομένα ελέγχου ενδέχεται να αποδειχθούν πολύτιμα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης, π.χ. στην περίπτωση που υπάρχουν ενδείξεις ότι τα δεδομένα που προκύπτουν από παράλληλους μάρτυρες αποκλίνουν σημαντικά σε σύγκριση με πρόσφατα δεδομένα από ζώα-μάρτυρες από την ίδια εγκατάσταση ελέγχου/αποικία. Εφόσον έχουν αξιολογηθεί, θα πρέπει να υποβάλλονται ιστορικά δεδομένα ελέγχου από το ίδιο εργαστήριο και να αφορούν ζώα της ίδιας ηλικίας και φυλής, τα οποία έχουν παραχθεί κατά τη διάρκεια των πέντε ετών που προηγήθηκαν της συγκεκριμένης μελέτης.

51. Όταν είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με τη βοήθεια στατιστικής μεθόδου γενικής αποδοχής. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης (παράγραφος 8). Η επιλογή θα πρέπει να προβλέπει διορθώσεις βάσει της επιβίωσης, εφόσον απαιτούνται.

Έκθεση δοκιμής

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

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα ταυτοποίησης,

— πηγή χημικής ουσίας,

— αριθμό παρτίδας,

— πιστοποιητικό χημικής ανάλυσης.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Για τα πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της επιλογής,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων στην αρχή της δοκιμής,

▼**M4**

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφή κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της οδού χορήγησης και της επιλογής δόσης,

— εφόσον έχουν χρησιμοποιηθεί, στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων,

— λεπτομερή στοιχεία της σύνθεσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/του παρασκευάσματος του σιτηρεσίου,

— αναλυτικά στοιχεία για τη συγκέντρωση, τη σταθερότητα και την ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— οδός χορήγησης και λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— στην περίπτωση αναπνευστικών μελετών, εάν αφορούσαν ρινική ή ολόσωμη έκθεση,

— πραγματικές δόσεις (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή ή το πόσιμο νερό (mg/kg ή ppm) σε πραγματική δόση, εφόσον είναι εφικτό,

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Αποτελέσματα (θα πρέπει να παρουσιάζονται συνοπτικά δεδομένα σε πίνακα και δεδομένα για το κάθε ζώο):

— δεδομένα επιβίωσης,

— βάρος του σώματος/μεταβολές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής, υπολογισμοί απόδοσης τροφής, εάν έχουν γίνει, και κατανάλωση νερού, κατά περίπτωση,

— δεδομένα τοξικής απόκρισης κατά φύλο και επίπεδο δόσης, συμπεριλαμβανομένων των τοξικών εκδηλώσεων,

— φύση, συχνότητα (και σοβαρότητα, εάν έχει αξιολογηθεί) και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (εάν είναι παροδικές ή μόνιμες),

— οφθαλμολογική εξέταση,

— αιματολογικές εξετάσεις,

— βιοχημικές εξετάσεις,

— αναλύσεις ούρων,

— αποτέλεσμα ενδεχόμενων εξετάσεων νευροτοξικότητας ή ανοσοτοξικότητας,

— τελικό βάρος σώματος,

— βάρος οργάνων (και λόγος βάρους οργάνων/σώματος, κατά περίπτωση),

— ευρήματα νεκροψίας,

— αναλυτική περιγραφή όλων των σχετικών με την αγωγή ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— δεδομένα για την απορρόφηση, εφόσον διατίθενται.

▼**M4**

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

— σχέσεις δόσης-απόκρισης,

— συνεκτίμηση τυχόν πληροφοριών για τον τρόπο δράσης της ουσίας,

— συζήτηση τυχόν προσεγγίσεων μοντελοποίησης,

— προσδιορισμός τιμών δόσης αναφοράς, NOAEL ή LOAEL,

— ιστορικά δεδομένα ελέγχου,

— σημασία για τον άνθρωπο.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, *ATLA* 32: 163-208.

(3) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. et al. (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, *Food. Chem. Toxicol.* 40, 145-191.

(4) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 437-445.

(5) Chapter B.27 of this Annex, Sub-chronic Oral Toxicity Test Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-Rodents.

(6) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, διαθέσιμο στον δημόσιο ιστότοπο του ΟΟΣΑ για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών, στη διεύθυνση www.oecd.org/env/testguidelines

(7) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) Κεφάλαιο B.8 του παρόντος παραρτήματος: Υποξεία αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 28 ημερών.

(9) Κεφάλαιο B.29 του παρόντος παραρτήματος: Υποχρόνια αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 90 ημερών.

(10) Κεφάλαιο B.9 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα επαναλαμβανόμενης (28 ημέρες) δόσης (δερματική).

(11) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. et al. (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.

(12) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. et al. (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.

(13) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. et al. (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.

▼M4

(14) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. et al. (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.

(15) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection, *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729-837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33).

(20) National Research Council (1985), Guide for the care and use of laboratory animals, NIH Publication No. 86-23, Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments, ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.

(24) IPCS (1986), Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980), Utility of the Neurologic Examination in Rats, *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.

(26) Gad S.C. (1982), A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology, *J. Toxicol.Environ. Health* 9: 691-704.

(27) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991), Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.

(28) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979), A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice, *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.

(29) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991), Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments, *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996), Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. et al. (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131, Προσάρτημα 1.

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών..

▼B

B.31. ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αναπαραγωγή της OECD TG 414 (2001).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος ελέγχου της τοξικότητας στην ανάπτυξη έχει σχεδιαστεί για την παροχή γενικών πληροφοριών σχετικά με τις επιπτώσεις της προγεννητικής έκθεσης στο κυοφορούν υπό δοκιμασία ζώο και στον οργανισμό που αναπτύσσεται στη μήτρα στις πληροφορίες αυτές μπορεί να περιλαμβάνονται αξιολόγηση των επιπτώσεων στην μητέρα, καθώς και τυχόν θάνατος, ανατομικές ανωμαλίες ή μη φυσιολογική αύξηση του εμβρύου. Οι λειτουργικές ανεπάρκειες, αν και σημαντικό μέρος της ανάπτυξης, δεν εντάσσονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμής. Αυτές μπορούν να ελεγχθούν σε ξεχωριστή μελέτη ή ως συμπλήρωμα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο δοκιμής για τη νευροτοξικότητα στην ανάπτυξη. Για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τον έλεγχο των λειτουργικών ανεπαρκειών και άλλων μεταγεννητικών επιπτώσεων, θα πρέπει να εξετάζεται η εφαρμογή της μεθόδου δοκιμής για τη μελέτη της τοξικότητας στην αναπαραγωγή σε δύο γενεές και για τη μελέτη της νευροτοξικότητας στην ανάπτυξη, ανάλογα.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής μπορεί να χρειάζεται κάποια ιδιαίτερη προσαρμογή σε επιμέρους περιπτώσεις με βάση κάποιες ειδικές γνώσεις για π.χ. τις φυσικοχημικές ή τοξικολογικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας. Η προσαρμογή αυτή είναι αποδεκτή, όταν υπάρχουν πειστικές επιστημονικές ενδείξεις ότι η προσαρμογή θα οδηγήσει σε δοκιμή με δυνατότητες παροχής περισσότερων, πληροφοριών. Σε μια τέτοια περίπτωση, οι επιστημονικές αυτές ενδείξεις θα πρέπει να τεκμηριώνονται προσεκτικά στην έκθεση της μελέτης.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Αναπτυξιακή τοξικολογία: η μελέτη των δυσμενών επιδράσεων στον αναπτυσσόμενο οργανισμό, που μπορεί να προκύψουν από την έκθεση πριν από τη σύλληψη, κατά τη διάρκεια της προγεννητικής ανάπτυξης ή μεταγεννητικώς μέχρι την εποχή της σεξουαλικής ωρίμανσης. Στις σημαντικότερες εκδηλώσεις της τοξικότητας στην ανάπτυξη περιλαμβάνονται 1) ο θάνατος του οργανισμού, 2) ανατομικές ανωμαλίες, 3) μη φυσιολογική αύξηση του οργανισμού και 4) λειτουργική ανεπάρκεια. Η αναπτυξιακή τοξικολογία αναφερόταν συχνά στο παρελθόν ως τερατολογία.

Δυσμενής επίδραση: κάθε αλλαγή σε σχέση με το φυσιολογικό επίπεδο, η οποία επέρχεται ως αποτέλεσμα της έκθεσης και η οποία μειώνει την ικανότητα επιβίωσης, αναπαραγωγής ή προσαρμογής στο περιβάλλον ενός οργανισμού. Σε σχέση με την αναπτυξιακή τοξικολογία, λαμβανόμενη στην ευρεία της έννοια, ο ορισμός αυτός περιλαμβάνει κάθε επίδραση η οποία παρεμβαίνει στη φυσιολογική ανάπτυξη του κυήματος, τόσο πριν όσο και μετά τη γέννηση.

Μη φυσιολογική αύξηση: ανωμαλίες στο βάρος ή στο μέγεθος των οργάνων ή του βάρους των γόνων.

Αλλοιώσεις **(ανωμαλίες):** ανατομικές αλλοιώσεις στην ανάπτυξη, στις οποίες περιλαμβάνονται τόσον οι δυσπλασίες όσο και οι παρεκκλίσεις (28).

Δυσπλασία/Μείζων ανωμαλία: Ανατομική διαφορά που θεωρείται ως επιζήμια για το ζώο (μπορεί να είναι και θανατηφόρα) και είναι, συνήθως, σπάνια

▼B

Παρέκκλιση/Ησσων ανωμαλία: Ανατομική διαφορά που θεωρείται ότι έχει μικρή ή μη επιζήμια επίδραση στο ζώο. Μπορεί να έχει μεταβατικό χαρακτήρα και να εμφανίζεται σχετικά συχνά στον πληθυσμό-μάρτυρα.

Κύημα: το σύνολο των παραγώγων ενός γονιμοποιημένου ωαρίου σε οποιοδήποτε στάδιο της ανάπτυξης από τη γονιμοποίηση μέχρι τη γέννηση, συμπεριλαμβανομένων των εξωεμβρυϊκών μεμβρανών, καθώς και του ίδιου του εμβρύου.

Εμφύτευση: προσκόλληση της βλαστικής κύστεως στο επιθήλιο της μήτρας, συμπεριλαμβανομένης της διείσδυσής του σε αυτό και της εγκατάστασής του στο ενδομήτριο.

Έμβρυο: το αρχικό ή αναπτυξιακό στάδιο οποιουδήποτε οργανισμού, ιδιαίτερα του αναπτυσσόμενου προϊόντος της γονιμοποίησης ενός ωού μετά την εμφάνιση του μακρού άξονα και μέχρι να παρουσιαστούν όλες οι βασικές δομές.

Εμβρυοτοξικότητα: επιβλαβής επίδραση στη φυσιολογική δομή, ανάπτυξη, αύξηση και/ή βιωσιμότητα ενός εμβρύου.

Διαμορφωμένο έμβρυο: ο αγέννητος γόνος κατά την μετεμβρυϊκή περίοδο.

Μετεμβρυοτοξικότητα: επιβλαβής επίδραση στη φυσιολογική δομή, ανάπτυξη, αύξηση και/ή βιωσιμότητα ενός διαμορφωμένου εμβρύου.

Αποβολή: η πρώιμη εκβολή από τη μήτρα των προϊόντων της σύλληψης: του εμβρύου ή μη βιώσιμου διαμορφωμένου εμβρύου.

Απορρόφηση: κύημα το οποίο, αφού εμφυτεύθηκε στη μήτρα, στη συνέχεια πέθανε και απορροφάται ή έχει απορροφηθεί.

Πρώιμη απορρόφηση: ενδείξεις εμφύτευσης χωρίς αναγνωρίσιμο έμβρυο/διαμορφωμένο έμβρυο

Όψιμη απορρόφηση: νεκρό έμβρυο ή διαμορφωμένο έμβρυο με εξωτερικές εκφυλιστικές διαφορές

NOAEL: συντομογραφία του no-observed-adverse-effect-level (επίπεδο μη παρατήρησης δυσμενών επιδράσεων). Είναι η μέγιστη δόση ή επίπεδο έκθεσης όπου δεν παρατηρούνται δυσμενή ευρήματα σχετικά με την αγωγή.

1.3 ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμμία.

1.4 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Κανονικά, η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται σε κυοφορούντα ζώα από την εμφύτευση μέχρι μία ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση, η οποία θα πρέπει να είναι όσο το δυνατό πλησιέστερα στην κανονική ημέρα του τοκετού χωρίς, όμως, να τίθεται υπό κίνδυνο η απώλεια δεδομένων από πρόωρο τοκετό. Η μέθοδος δοκιμής δεν αποσκοπεί αποκλειστικά στην εξέταση της περιόδου της οργανογένεσης (π.χ. 5-15η ημέρα στα τρωκτικά και 6-18η ημέρα στα κουνέλια) αλλά ξεκινά από την προεμφύτευση, όπου γίνεται, και καλύπτει όλη την περίοδο της κύησης μέχρι την ημέρα πριν από την καισαρική τομή. Λίγο πριν από την καισαρική τομή, τα θηλυκά θανατώνονται, το περιεχόμενο της μήτρας εξετάζεται και τα έμβρυα αξιολογούνται από πλευράς ορατών εξωτερικά ανωμαλιών και διαφορών στους μαλακούς ιστούς και στο σκελετό.

▼B

1.5 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1 **Επιλογή του είδους του ζώου**

Συνιστάται η δοκιμή να γίνεται στο πλέον σχετικό είδος και να χρησιμοποιούνται τα εργαστηριακά είδη και φυλές που χρησιμοποιούνται συνήθως σε δοκιμές προγεννητικής τοξικότητας στην ανάπτυξη. Το προτιμούμενο είδος τρωκτικού είναι ο επίμυς και το προτιμούμενο είδος μη τρωκτικού είναι του κουνέλι. Εάν χρησιμοποιηθεί κάποιο άλλο είδος, θα πρέπει να παρέχεται και σχετική αιτιολόγηση.

1.5.2 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία στο θάλαμο πειραματισμού των ζώων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3°) για τα τρωκτικά και 18 °C (± 3°) για τα κουνέλια. Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 % εκτός κατά τη διάρκεια του καθαρισμού του θαλάμου, στόχος θα πρέπει να είναι μια υγρασία 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή 12 ωρών φωτός και 12 ωρών σκότους. Για τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθεις εργαστηριακές δίαιτες με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

Οι διαδικασίες του ζευγαρώματος θα πρέπει να γίνονται σε κλουβιά κατάλληλα για το σκοπό αυτό. Αν και προτιμάται τα ζώα που ζευγαρώνουν να είναι μόνα τους σε ένα κλουβί, η ομαδική συστέγαση σε μικρούς αριθμούς είναι και αυτή αποδεκτή.

1.5.3 **Προετοιμασία των ζώων**

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα, τα οποία να έχουν εγκλιματιστεί στις εργαστηριακές συνθήκες για 5 ημέρες τουλάχιστον και να μην έχουν υποβληθεί σε προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες. Τα υπό δοκιμή ζώα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, τη φυλή, την προέλευση, το φύλο, το βάρος και/ή την ηλικία. Τα ζώα όλων των υπό δοκιμή ομάδων θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να έχουν ομοιόμορφο βάρος και ηλικία. Σε κάθε επίπεδο δόσης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά ενήλικα άτοκα θηλυκά ζώα. Τα θηλυκά θα πρέπει να ζευγαρώνουν με αρσενικά του ίδιου είδους και φυλής, ενώ θα πρέπει να αποφεύγεται το ζευγάρωμα αμφιθαλών ατόμων. Για τα τρωκτικά, ημέρα 0 της κύησης είναι η ημέρα κατά την οποία παρατηρούνται κολπικό βύσμα και/ή σπέρμα. Για τα κουνέλια, ημέρα 0 είναι συνήθως η ημέρα της συνουσίας ή της τεχνητής έγχυσης σπέρματος, εφόσον χρησιμοποιείται η τεχνική αυτή. Τα ζευγαρωμένα θηλυκά θα πρέπει να εντάσσονται με τυχαίο τρόπο στις ομάδες μαρτυρίας και δοκιμής. Τα κλουβιά θα πρέπει να τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται το ενδεχόμενο επιδράσεων λόγω της θέσης των κλουβιών. Σε κάθε ζώο θα πρέπει να δίνεται ένας αποκλειστικός αριθμός αναγνώρισης. Τα ζευγαρωμένα θηλυκά θα πρέπει να εντάσσονται με τυχαίο τρόπο στις ομάδες μαρτυρίας και δοκιμής και, εάν τα θηλυκά είναι ζευγαρωμένα σε παρτίδες, τα ζώα σε κάθε παρτίδα θα πρέπει να κατανέμονται ομοιόμορφα στις ομάδες. Ομοίως, τα θηλυκά που έχουν γονιμοποιηθεί με τεχνητή έγχυση από το ίδιο αρσενικό, θα πρέπει να κατανέμονται ομοιόμορφα στις ομάδες.

1.6 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.6.1 **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Κάθε ομάδα δοκιμής και μαρτυρίας θα πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό θηλυκών ώστε κατά τη νεκροψία να υπάρχουν 20 περίπου θηλυκά με εμφυτεύσεις. Ομάδες με λιγότερα από 16 ζώα με εμφυτεύσεις μπορεί να μην είναι κατάλληλες. Η θνησιμότητα των μητέρων δεν ακυρώνει κατ' ανάγκη τη μελέτη, υπό την προϋπόθεση ότι δεν υπερβαίνει το 10 % περίπου.

▼B

1.6.2 **Ετοιμασία των δόσεων**

Εάν, για τη διευκόλυνση της παροχής της ουσίας, χρησιμοποιείται φορέας ή άλλο πρόσθετο, θα πρέπει να εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: οι επιδράσεις στην απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό και την κατακράτηση ή απέκκριση της υπό δοκιμή ουσίας, οι επιδράσεις στις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας που μπορεί να μεταβάλουν τις τοξικές της ιδιότητες και οι επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή της διατροφικής κατάστασης των ζώων. Ο φορέας δεν θα πρέπει να παρουσιάζει τοξικές επιδράσεις στην ανάπτυξη, ούτε επιδράσεις στην αναπαραγωγή.

1.6.3 **Δοσολογία**

Κανονικά, η υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει να χορηγείται καθημερινά από την εμφύτευση (π.χ., την 5η ημέρα από το ζευγάρωμα) μέχρι την ημέρα πριν από την προγραμματιζόμενη καισαρική τομή. Εάν, από υφιστάμενες προκαταρκτικές μελέτες, δεν φαίνεται να υπάρχουν ιδιαίτερες πιθανότητες προεμφυτευτικών απωλειών, η αγωγή μπορεί να επεκταθεί ώστε να συμπεριληφθεί ολόκληρη η περίοδος της κύησης, από το ζευγάρωμα μέχρι την ημέρα πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση. Είναι γνωστό ότι τυχόν ακατάλληλοι χειρισμοί ή καταπονήσεις κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να απολήξουν σε προγεννητικές απώλειες. Για την αποφυγή προγεννητικών απωλειών από παράγοντες που δεν σχετίζονται με την αγωγή, θα πρέπει να αποφεύγονται μη αναγκαίοι χειρισμοί των εγκύων ζώων καθώς και καταπονήσεις από εξωτερικούς παράγοντες όπως π.χ. οι θόρυβοι.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και ένας συντρέχων μάρτυρας. Τα υγιή ζώα θα πρέπει να εντάσσονται αβίαστα στις ομάδες μαρτυρίας και δοκιμής. Τα επίπεδα των δόσεων θα πρέπει να είναι κλιμακωμένα έτσι ώστε να επέρχεται μια διαβάθμιση των τοξικών επιδράσεων. Εκτός κι αν υπάρχουν περιορισμοί λόγω της φυσικής/χημικής φύσεως ή των βιολογικών ιδιοτήτων της υπό δοκιμή ουσίας, η μέγιστη δόση θα πρέπει να επιλέγεται με στόχο να προκαλεί κάποια τοξική δράση στην ανάπτυξη και/ή την μητέρα (κλινικά σημεία ή μείωση στο βάρος του σώματος) αλλά όχι θάνατο ή σοβαρή ταλαιπωρία. Ένα τουλάχιστον ενδιάμεσο επίπεδο δόσης θα πρέπει να επιφέρει κάποια ελάχιστα αντιληπτά τοξικά αποτελέσματα. Το μικρότερο επίπεδο δόσης δεν θα πρέπει να παρέχει οποιαδήποτε ένδειξη τοξικής δράσης στη μητέρα ή στην ανάπτυξη του εμβρύου. Θα πρέπει να επιλέγεται μια φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσεων με σκοπό να γίνεται αντιληπτή κάθε απόκριση σχετική με τη δοσολογία και το επίπεδο μη παρατήρησης δυσμενών επιδράσεων (NOAEL). Για τη διαμόρφωση της φθίνουσας σειράς επιπέδων δόσεων, ο καλύτερος συχνά τρόπος είναι η χρησιμοποίηση διπλών ή τετραπλών διαστημάτων, ενώ η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συχνά προτιμότερη από τη χρησιμοποίηση πολύ μεγάλων διαστημάτων (π.χ. με συντελεστή άνω του 10) μεταξύ των δόσεων. Αν και στόχος είναι ο προσδιορισμός ενός μητρικού NOAEL, μπορούν να γίνουν δεκτές και μελέτες που δεν προσδιορίζουν ένα τέτοιο επίπεδο (1).

Τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να επιλέγονται λαμβάνοντας υπόψη όλα τα υπάρχοντα δεδομένα τοξικότητας καθώς και πρόσθετα στοιχεία για το μεταβολισμό και την τοξικοκινητικότητα της υπό δοκιμή ουσίας ή συναφών ουσιών. Τα στοιχεία αυτά βοηθούν επίσης και στην κατάδειξη της καταλληλότητας της δοσολογικής αγωγής.

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια συντρέχουσα ομάδα μαρτύρων. Η ομάδα αυτή θα πρέπει να συνίσταται σε μια κατ' επίφαση υποβληθείσα σε αγωγή ομάδα μαρτύρων ή ομάδα με μάρτυρες στους οποίους έχει χορηγηθεί φορέας εφόσον, για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας, χρησιμοποιείται φορέας. Σε όλες τις ομάδες θα πρέπει να χορηγείται η ίδια ποσότητα ουσίας υπό δοκιμή ή φορέα. Η μεταχείριση των ζώων στην ή στις ομάδες μαρτύρων θα πρέπει να είναι ίδια με εκείνη των ζώων των ομάδων δοκιμής. Στις ομάδες μαρτυρίας με χρήση φορέα, ο φορέας θα πρέπει να χορηγείται στη μέγιστη χρησιμοποιούμενη ποσότητα (όπως και στην ομάδα αγωγής με τη χαμηλότερη δόση).

▼B

1.6.4 **Δοκιμή ορίου**

Εάν δοκιμή με ένα μόνο επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα από το στόμα, χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται για την παρούσα μελέτη, δεν εμφανίζει κάποια αντιληπτή τοξική δράση στα κυοφορούντα ζώα ή στους γόνους τους και εφόσον, από τα υφιστάμενα δεδομένα (π.χ. από ουσίες με παρόμοια δομή και/ή μεταβολισμό), δεν αναμένεται η εμφάνιση τέτοιας δράσης, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η διενέργεια πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσεων. Από την αναμενόμενη έκθεση του ανθρώπου μπορεί να εκπορευθεί η ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης από το στόμα στη δοκιμή ορίου. Σε άλλους τρόπους χορήγησης, όπως η εισπνοή ή η δερματική επίθεση, από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας μπορεί, συχνά, να υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ή περιορισμοί ως προς το μέγιστο εφικτό επίπεδο έκθεσης (π.χ., η δερματική επίθεση δεν θα πρέπει να προκαλεί σοβαρή τοπική τοξικότητα).

1.6.5 **Χορήγηση δόσεων**

Η υπό δοκιμή ουσία ή φορέας χορηγείται, συνήθως, από το στόμα με διασωλήνωση. Εάν χρησιμοποιηθεί κάποια άλλη οδός χορήγησης, ο ερευνητής θα πρέπει να αναφέρει τους λόγους και να αιτιολογεί την επιλογή του, ενώ μπορεί να χρειάζονται κάποιες κατάλληλες τροποποιήσεις (2)(3)(4). Η υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει να χορηγείται την ίδια ώρα περίπου κάθε μέρα.

Η δόση στα επιμέρους ζώα θα πρέπει κανονικά να βασίζεται στον πλέον πρόσφατο προσδιορισμό του βάρους του σώματος κάθε ζώου. Ωστόσο, θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή όταν η προσαρμογή της δόσης γίνεται κατά τη διάρκεια του τελευταίου τριμήνου της κυήσεως. Για την επιλογή των δόσεων θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υφιστάμενα δεδομένα για την παρεμπόδιση εμφάνισης φαινομένων υπερβολικής τοξικότητας στη μητέρα. Ωστόσο, εάν στις υπό αγωγή μητέρες παρατηρηθούν φαινόμενα υπερβολικής τοξικότητας, τα ζώα αυτά θα πρέπει να θανατώνονται με ανθρωπιστικό τρόπο. Εάν κάποια κυοφορούντα ζώα δείχνουν σημεία υπερβολικής τοξικότητας, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα τερματισμού της δοκιμή στη δοσολογική αυτή ομάδα. Όταν η ουσία χορηγείται με καθετήρα δια του στόματος, αυτή θα πρέπει κατά προτίμηση να δίδεται ως εφάπαξ δόση στα ζώα χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα ή κατάλληλο σωλήνα διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγείται άπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του υπό δοκιμή ζώου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, εκτός στην περίπτωση υδατικών διαλυμάτων όπου μπορούν να χρησιμοποιούνται 2 ml/100 g βάρους σώματος. Όταν ως φορέας χρησιμοποιείται αραβοσιτέλαιο, ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 0,4 ml/100 g βάρους σώματος. Η διακύμανση στον όγκο δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται προσαρμόζοντας τις συγκεντρώσεις ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσεων.

1.6.6 **Παρατήρηση των μητέρων**

Μια φορά τουλάχιστον την ημέρα θα πρέπει να γίνονται και να καταγράφονται κλινικές παρατηρήσεις, κατά . προτίμηση την ίδια ή τις ίδιες χρονικές στιγμές κάθε μέρα, λαμβάνοντας υπόψη την περίοδο κορύφωσης των προβλεπόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση. Η κατάσταση των ζώων θα πρέπει να καταγράφεται συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, των ετοιμοθάνατων, των σχετικών αλλαγών στη συμπεριφορά και όλων των σημείων έκδηλης τοξικότητας.

1.6.7 **Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής**

Τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται την ημέρα 0 της κυήσεως ή το αργότερο την 3η ημέρα της κυήσεως εάν τα ζώα που ζευγαρώνουν τα προμηθεύει εξωτερικός τροφέας, την πρώτη ημέρα της χορήγησης, τουλάχιστον κάθε 3 ημέρες κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης και την ημέρα της προγραμματισμένης θανάτωσης.

▼B

Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να καταγράφεται ανά διαστήματα τριών ημερών και θα πρέπει να συμπίπτει με τις ημέρες προσδιορισμού του βάρους του σώματος.

1.6.8 **Μεταθανάτιος εξέταση**

Τα θηλυκά θα πρέπει να θανατώνονται μια ημέρα πριν από την αναμενόμενη ημέρα του τοκετού. Θηλυκά τα οποία εμφανίζουν σημεία αποβολής ή προώρου τοκετού πριν από την προγραμματισμένη θανάτωση θα πρέπει να θανατώνονται και να υποβάλλονται σε επισταμένη μακροσκοπική εξέταση.

Σε περίπτωση τερματισμού ή θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, η μητέρα θα πρέπει να εξετάζεται μακροσκοπικά για τυχόν ανατομικές ανωμαλίες ή παθολογικές αλλαγές. Η αξιολόγηση των μητέρων κατά τη διάρκεια της καισαρικής τομής και οι μεταγενέστερες αναλύσεις του διαμορφωμένου εμβρύου θα πρέπει να διεξάγονται κατά προτίμηση χωρίς να είναι γνωστή η ομάδα δοκιμής για την ελαχιστοποίηση μεροληπτικών συμπερασμάτων.

1.6.9 **Εξέταση του περιεχομένου της μήτρας**

Αμέσως μετά τον τερματισμό ή το συντομότερο δυνατό μετά το θάνατο, οι μήτρες θα πρέπει να αφαιρούνται και να διαπιστώνεται η κατάσταση κυήσεως των ζώων. Μήτρες που δεν εμφανίζονται σε έγγυο κατάσταση θα πρέπει να εξετάζονται περαιτέρω (π.χ. με χρώση θειούχου αμμωνίου για τα τρωκτικά και με χρώση Salewski ή κατάλληλη εναλλακτική μέθοδο για τα κουνέλια) για την επιβεβαίωση της μη εγγύου καταστάσεως (5).

Οι έγγυοι μήτρες, συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου, θα πρέπει να ζυγίζονται. Βάρη εγγύων μητρών δεν θα πρέπει να λαμβάνονται από ζώα που ανευρέθησαν νεκρά κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Στα έγγυα ζώα θα πρέπει να προσδιορίζεται ο αριθμός των ωχρών σωματίων.

Το περιεχόμενο των μητρών θα πρέπει να εξετάζεται ως προς τον αριθμό των θανάτων εμβρύων ή διαμορφωμένων εμβρύων και βιώσιμων διαμορφωμένων εμβρύων. Θα πρέπει να περιγράφεται ο βαθμός της απορρόφησης για να εκτιμάται ο σχετικός χρόνος θανάτου του κυήματος (βλέπε τμήμα 1.2).

1.6.10 **Εξέταση διαμορφωμένων εμβρύων**

Θα πρέπει να προσδιορίζεται το φύλο και το σωματικό βάρος κάθε διαμορφωμένου εμβρύου.

Κάθε διαμορφωμένο έμβρυο θα πρέπει να εξετάζεται για εξωτερικές αλλοιώσεις (6).

Τα διαμορφωμένα έμβρυα θα πρέπει να εξετάζονται για σκελετικές αλλοιώσεις και αλλοιώσεις του μαλακού ιστού (π.χ. παρεκκλίσεις και δυσπλασίες ή ανωμαλίες) (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)-(17)(18)(19)(20) (21)(22)(23)(24). Είναι επιθυμητή, αλλά όχι και απαιτητή, η κατηγοριοποίηση των αλλοιώσεων των διαμορφωμένων εμβρύων. Εφόσον γίνει κατηγοριοποίηση, θα πρέπει να δηλώνονται σαφώς τα κριτήρια καθορισμού κάθε κατηγορίας. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στο αναπαραγωγικό σύστημα, το οποίο θα πρέπει να εξετάζεται για τυχόν ύπαρξη σημείων ανώμαλης ανάπτυξης.

Στην περίπτωση των τρωκτικών, θα πρέπει να ετοιμάζεται και να εξετάζεται το ήμισυ κάθε γέννας για σκελετικές αλλοιώσεις. Τα υπόλοιπα θα πρέπει να ετοιμάζονται και να εξετάζονται για αλλοιώσεις του μαλακού ιστού, χρησιμοποιώντας αποδεκτές ή κατάλληλες μεθόδους σειριακής τομής ή προσεκτικές τεχνικές αδρής εκτομής.

▼B

Στην περίπτωση μη τρωκτικών, π.χ. κουνέλια, όλα τα διαμορφωμένα έμβρυα θα πρέπει να εξετάζονται τόσο για σκελετικές, όσο και για αλλοιώσεις του μαλακού ιστού. Τα σώματα των διαμορφωμένων αυτών εμβρύων αξιολογούνται με προσεκτική εκτομή για τυχόν αλλοιώσεις του μαλακού ιστού, συμπεριλαμβανομένων ενδεχομένως και διαδικασιών για περαιτέρω αξιολόγηση της εσωτερικής καρδιακής κατασκευής (25). Τα κεφάλια του ημίσεος αριθμού τών διαμορφωμένων εμβρύων που εξετάζονται με τον τρόπο αυτό θα πρέπει να αφαιρούνται και να υποβάλλονται σε επεξεργασία για αξιολόγηση τυχόν αλλοιώσεων του μαλακού ιστού (συμπεριλαμβανομένων των οφθαλμών, του εγκεφάλου, των ρινικών διόδων και της γλώσσας), χρησιμοποιώντας τυποποιημένες μεθόδους σειριακής τομής (26) ή κάποια εξίσου ευαίσθητη μέθοδο. Τα σώματα των διαμορφωμένων αυτών εμβρύων και τα υπόλοιπα άθικτα διαμορφωμένα έμβρυα θα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία και να εξετάζονται για σκελετικές αλλοιώσεις, χρησιμοποιώντας τις ίδιες μεθόδους με εκείνες που περιγράφτηκαν για τα τρωκτικά.

2 ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα δεδομένα θα αναφέρονται κατ' άτομο για τις μητέρες καθώς και για τους γόνους τους και θα συνοψίζονται σε μορφή πινάκων, εμφαίνοντας για κάθε ομάδα δοκιμής τον. αριθμό των ζώων στην αρχή της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για ανθρωπιστικούς λόγους, τη χρονική στιγμή κάθε θανάτου ή ανθρωπιστικής θανάτωσης, τον αριθμό των εγγύων θηλυκών, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, μια περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της χρονικής στιγμής εμφάνισης, της διάρκειας και της σοβαρότητας κάθε τοξικού αποτελέσματος, τους τύπους των παρατηρήσεων στα έμβρυα/διαμορφωμένα έμβρυα και κάθε σχετικό στοιχείο για τις γέννες.

Τα αριθμητικά αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο χρησιμοποιώντας τη γέννα ως μονάδα για ανάλυση δεδομένων. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια γενικώς αποδεκτή στατιστική μέθοδος. Οι στατιστικές μέθοδοι θα πρέπει να επιλέγονται ως τμήμα του σχεδιασμού της μελέτης και θα πρέπει να αιτιολογούνται. Θα πρέπει, επίσης, να αναφέρονται και στοιχεία από ζώα τα οποία δεν επιβιώνουν μέχρι την προγραμματισμένη θανάτωση. Τα στοιχεία αυτά μπορούν να περιλαμβάνονται στους μέσους όρους της ομάδας, όπου είναι σκόπιμο. Η σπουδαιότητα των στοιχείων που λαμβάνονται από τέτοια ζώα και, συνεπώς, η λήψη υπόψη ή ο αποκλεισμός τους από τον ή τους μέσους όρους για κάθε ομάδα, θα πρέπει να αιτιολογείται και να κρίνεται σε ατομική βάση.

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα ευρήματα της μελέτης της προγεννητικής τοξικότητας στην ανάπτυξη θα πρέπει να αξιολογούνται από πλευράς παρατηρούμενων αποτελεσμάτων. Στην αξιολόγηση πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

— αποτελέσματα των δοκιμών στις μητέρες και στα έμβρυα/διαμορφωμένα έμβρυα, συμπεριλαμβανομένης αξιολόγησης της σχέσης, ή της έλλειψης σχέσεως, μεταξύ της έκθεσης των ζώων στην υπό δοκιμή ουσία και της συχνότητας και σοβαρότητας όλων των ευρημάτων,

— κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την κατηγοριοποίηση εξωτερικών και σκελετικών αλλοιώσεων ή αλλοιώσεων του μαλακού ιστού των διαμορφωμένων εμβρύων, εφόσον έχει γίνει τέτοια κατηγοριοποίηση,

▼B

— εφόσον είναι σκόπιμο, ιστορικά μαρτυρικά στοιχεία για ενίσχυση της ερμηνείας των αποτελεσμάτων της μελέτης,

— οι αριθμοί που χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό όλων των ποσοστών ή δεικτών,

— κατάλληλη στατιστική ανάλυση των ευρημάτων της μελέτης, όπου είναι σκόπιμο, στην οποία θα πρέπει να περιλαμβάνονται επαρκείς πληροφορίες για τη μέθοδο αναλύσεως, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει επαναξιολόγηση και ανασκευή της ανάλυσης από ανεξάρτητο αναθεωρητή/στατιστικολόγο.

Σε κάθε μελέτη που δείχνει απουσία τυχόν τοξικών επιδράσεων, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διενέργειας περαιτέρω ερευνών για εντοπισμό της απορρόφησης και βιοδιαθεσιμότητας της υπό δοκιμή ουσίας.

2.3 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η διενέργεια μελέτης προγεννητικής τοξικότητας στην ανάπτυξη παρέχει πληροφορίες για τα αποτελέσματα επανειλημμένης έκθεσης σε μια ουσία κατά τη διάρκεια της κύησης στις μητέρες και στην εντός της μήτρας ανάπτυξη των γόνων τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με τα ευρήματα από μελέτες υποχρόνιας τοξικότητας, αναπαραγωγής, τοξικοκινητικής και άλλες μελέτες. Αφού δίνεται έμφαση τόσο στη γενική τοξικότητα από πλευράς μητρικής τοξικότητας όσο και στα τελικά τοξικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη, τα αποτελέσματα της μελέτης επιτρέπουν σε ένα ορισμένο βαθμό να γίνει διάκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων στην ανάπτυξη που επέρχονται απουσία γενικής τοξικότητας και εκείνων που προκαλούνται μόνον σε επίπεδα τα οποία είναι τοξικά και στη μητέρα (27).

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες ειδικές πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία:

— φυσική εμφάνιση και, όπου είναι σκόπιμο, φυσικοχημικές ιδιότητες

— ταυτοποίηση, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού CAS, αν είναι γνωστός/υπάρχει

— καθαρότητα

Φορέας (αν χρησιμοποιείται):

— αιτιολόγηση επιλογής του συγκεκριμένου φορέα, αν είναι άλλος από νερό

Υπό δοκιμή ζώα:

— χρησιμοποιούμενο είδος και φυλή

— αριθμός και ηλικία των ζώων

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διαιτολόγιο, κ.λπ.

— επιμέρους βάρη ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής

Συνθήκες δοκιμής:

— λογική αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσεων

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή ουσίας/τροφής, επιτυγχανόμενη συγκέντρωση, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος

▼B

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας

— αναγωγή από τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή/πόσιμο νερό (ppm) στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον γίνεται

— περιβαλλοντικές συνθήκες

— λεπτομέρειες ποιότητας τροφής και νερού.

Αποτελέσματα:

Στοιχεία σχετικά με τη μητρική τοξική απόκριση κατά δόση, στα οποία πρέπει να συμπεριλαμβάνονται, χωρίς αυτό να αποκλείει την αναφορά και άλλων στοιχείων:

— ο αριθμός των ζώων στην έναρξη της δοκιμής, ο αριθμός των επιβιωσάντων ζώων, ο αριθμός των εγγύων και ο αριθμός των αποβολών, καθώς και ο αριθμός των ζώων με πρόωρο τοκετό

— η ημέρα θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή αν τα ζώα επέζησαν μέχρι τέλος

— στοιχεία από ζώα που δεν επιβιώνουν μέχρι την προγραμματισμένη θανάτωση θα πρέπει να αναφέρονται αλλά να μην περιλαμβάνονται στις στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ ομάδων

— η ημέρα παρατήρησης κάθε μη φυσιολογικού κλινικού σημείου και η εν συνεχεία εξέλιξη

— τα σωματικά βάρη, η μεταβολή των σωματικών βαρών και των βαρών εγγύων μητρών συμπεριλαμβανομένων, ενδεχομένως, και των μεταβολών σωματικών βαρών διορθωμένων βάσει του βάρους των εγγύων μητρών,

— η κατανάλωση τροφής και, εφόσον μετριόταν, και η κατανάλωση νερού

— τα ευρήματα της νεκροψίας, συμπεριλαμβανομένου του βάρους των μητρών

— θα πρέπει να αναφέρονται οι τιμές NOAEL για τη μητρική και αναπτυξιακή τοξικότητα.

Αναπτυξιακά τελικά σημεία κατά δόση για γέννες με εμφυτεύματα, συμπεριλαμβανομένων:

— του αριθμού των ωχρών σωματίων

— του αριθμού των εμφυτεύσεων, του αριθμού και του ποσοστού των ζώντων και νεκρών διαμορφωμένων εμβρύων και απορροφήσεων

— του αριθμού και ποσοστού των προ και μετά εμφύτευση απωλειών

Αναπτυξιακά τελικά σημεία κατά δόση για γέννες με ζώντα διαμορφωμένα έμβρυα, συμπεριλαμβανομένων:

— του αριθμού και ποσοστού των ζώντων γόνων

— της αναλογίας μεταξύ φύλων

— του βάρους του σώματος των διαμορφωμένων εμβρύων, κατά προτίμηση κατά φύλο και ασχέτως φύλου

— των εξωτερικών, σκελετικών και δυσπλασιών του μαλακού ιστού και άλλων σχετικών αλλοιώσεων

— των κριτηρίων κατηγοριοποίησης, αν έγινε

▼B

— του συνολικού αριθμού και ποσοστού διαμορφωμένων εμβρύων και γεννών με εξωτερικές, σκελετικές ή αλλοιώσεις του μαλακού ιστού, καθώς επίσης και των τύπων και συχνότητας επιμέρους ανωμαλιών και άλλων σχετικών αλλοιώσεων.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4 **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Phannakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; :381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino.Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼M4

Β.32. ΜΕΛΕΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 451 του ΟΟΣΑ (2009). Η αρχική TG 451 για τις μελέτες καρκινογενετικότητας εκδόθηκε το 1981. Θεωρήθηκε απαραίτητο να αναπτυχθεί η παρούσα αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών Β.32 ώστε να αντανακλά τις πλέον πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της καλής μεταχείρισης των ζώων και τις κανονιστικές απαιτήσεις (2) (3) (4) (5) (6). Η επικαιροποίηση της παρούσας μεθόδου δοκιμών Β.32 διενεργήθηκε παράλληλα με τις αναθεωρήσεις του κεφαλαίου Β.30 «Μελέτες χρόνιας τοξικότητας» και του κεφαλαίου Β.33 «Συνδυασμένες μελέτες χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας» του παρόντος παραρτήματος, με στόχο τη λήψη πρόσθετων πληροφοριών από τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και την παροχή περαιτέρω λεπτομερών στοιχείων για την επιλογή των δόσεων. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.32 έχει σχεδιαστεί ώστε να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ενός ευρέος φάσματος χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων φυτοφαρμάκων και βιομηχανικών χημικών ουσιών. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες λεπτομέρειες και απαιτήσεις ενδέχεται να διαφέρουν στην περίπτωση φαρμακευτικών ουσιών (βλέπε καθοδήγηση S1B της Διεθνούς διάσκεψης Εναρμόνισης (ICH) για τον έλεγχο της καρκινογενετικότητας φαρμακευτικών ουσιών).

2. Στην πλειονότητά τους, οι μελέτες καρκινογενετικότητας διεξάγονται σε είδη τρωκτικών. Επομένως και η παρούσα μέθοδος δοκιμών προορίζεται να εφαρμόζεται κυρίως σε μελέτες διεξαγόμενες με αυτά τα είδη. Εάν απαιτείται η διεξαγωγή τέτοιων μελετών σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, εφαρμόζονται, με κατάλληλες τροποποιήσεις, οι αρχές και οι διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, μαζί με αυτές που περιγράφονται στο κεφάλαιο Β.27 «Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά» του παρόντος παραρτήματος (6). Περαιτέρω κατευθύνσεις περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ για τον σχεδιασμό και τη διεξαγωγή μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (7).

3. Οι τρεις βασικές οδοί χορήγησης ουσιών που χρησιμοποιούνται σε μελέτες καρκινογενετικότητας είναι μέσω του στόματος, μέσω του δέρματος και μέσω της εισπνοής. Η επιλογή οδού χορήγησης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την κύρια οδό έκθεσης του ανθρώπου. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδού έκθεσης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εστιάζει στην έκθεση μέσω του στόματος, τη συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη οδό στις μελέτες καρκινογενετικότητας. Παρόλο που οι μελέτες καρκινογενετικότητας που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω του δέρματος ή της αναπνευστικής οδού ενδέχεται να είναι επίσης απαραίτητες για την εκτίμηση των κινδύνων για την υγεία και/ή ενδέχεται να απαιτούνται βάσει συγκεκριμένων κανονιστικών καθεστώτων, και οι δύο οδοί έκθεσης είναι τεχνικά πολύπλοκες σε σημαντικό βαθμό. Παρόλο που οι μελέτες αυτές θα πρέπει να σχεδιάζονται κατά περίπτωση, η μέθοδος δοκιμών που περιγράφεται στο κεφάλαιο αυτό για την εκτίμηση και την αξιολόγηση της καρκινογενετικότητας που προκαλείται με χορήγηση από το στόμα θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση ενός πρωτοκόλλου για αναπνευστικές και/ή δερματικές μελέτες όσον αφορά συστάσεις για περιόδους αγωγής, κλινικές και παθολογικές παραμέτρους κ.λπ. Ο ΟΟΣΑ έχει εκδώσει έγγραφα καθοδήγησης σχετικά με τη χορήγηση ελεγχόμενων χημικών ουσιών μέσω μέσω του δέρματος (7) και μέσω της αναπνευστικής οδού (7)(8). Τα κεφάλαια Β.8 (9) και Β.29 (10) του παρόντος παραρτήματος, καθώς και το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (8), θα πρέπει να λαμβάνονται ιδιαιτέρως υπόψη κατά τον σχεδιασμό πιο μακροπρόθεσμων μελετών που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού. Το κεφάλαιο Β.9 του παρόντος παραρτήματος (11) θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαιτέρως υπόψη στην περίπτωση δοκιμών μέσω του δέρματος.

▼M4

5. Η μελέτη καρκινογενετικότητας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους για την υγεία που ενδέχεται να προκύπτουν από επανειλημμένη έκθεση έως και για ολόκληρη τη διάρκεια ζωής του χρησιμοποιούμενου είδους. Η μελέτη παρέχει πληροφορίες για τις τοξικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής καρκινογενετικότητας, για ενδεχόμενα όργανα στόχο και για την πιθανότητα συσσώρευσης. Παρέχει εκτίμηση του μέγιστου επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς τοξικές επιδράσεις και, στην περίπτωση μη γονιδιοτοξικών καρκινογόνων, αντιδράσεις εμφάνισης όγκου, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση του ανθρώπου. Τονίζεται επίσης η ανάγκη προσεκτικής κλινικής παρατήρησης των πειραματόζωων προκειμένου να ληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες.

6. Οι στόχοι των μελετών καρκινογενετικότητας που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνουν:

— τον προσδιορισμό των καρκινογόνων ιδιοτήτων μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας οι οποίες προκαλούν αυξημένη συχνότητα νεοπλασμάτων, αυξημένο ποσοστό κακοηθών νεοπλασμάτων ή μείωση του χρόνου που μεσολαβεί έως την εμφάνιση νεοπλασμάτων, σε σύγκριση με δοκιμασίες με παράλληλες ομάδες μαρτύρων,

— τον προσδιορισμό οργάνων-στόχου καρκινογενετικότητας,

— τον προσδιορισμό του χρόνου που μεσολαβεί έως την εμφάνιση νεοπλασμάτων,

— τον χαρακτηρισμό της σχέσης δόσης όγκου-απόκρισης,

— τον προσδιορισμό του επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL) ή της αφετηρίας για τον καθορισμό δόσης αναφοράς (BMD),

— την παρέκταση των καρκινογόνων επιδράσεων στην έκθεση του ανθρώπου σε χαμηλά επίπεδα δόσης,

— την παροχή δεδομένων για τον έλεγχο υποθέσεων σχετικά με τον τρόπο δράσης (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Κατά την εκτίμηση και την αξιολόγηση της ενδεχόμενης καρκινογενετικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, το πειραματικό εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, ώστε να εστιάζεται ο σχεδιασμός στον πλέον αποδοτικό έλεγχο του δυναμικού καρκινογενετικότητας και να ελαχιστοποιείται η χρήση των ζώων. Οι πληροφορίες και η μελέτη του τρόπου δράσης μιας ουσίας για την οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι καρκινογόνος (2) (7) (12) (13) (14) (15) είναι ιδιαιτέρως σημαντικές, δεδομένου ότι ο βέλτιστος σχεδιασμός ενδέχεται να διαφέρει ανάλογα με το εάν είναι γνωστό ή υπάρχουν υπόνοιες ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι γονιδιοτοξική καρκινογόνος ουσία. Περαιτέρω κατευθύνσεις για ζητήματα σχετικά με τον τρόπο δράσης περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (9).

8. Πληροφορίες που θα βοηθήσουν στον σχεδιασμό της μελέτης είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας· τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας *in vitro* ή *in vivo*, συμπεριλαμβανομένων δοκιμών γονιδιοτοξικότητας· οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου· τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR, δεδομένα μεταλλαξιγένεσης/γονιδιοτοξικότητας, καρκινογενετικότητας και άλλα τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς χημικές ουσίες· διαθέσιμα τοξικοκινητικά δεδομένα (κινητική εφάπαξ δόσης και, επίσης, επαναλαμβανόμενης δόσης, εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα τέτοια δεδομένα) και δεδομένα που προέρχονται από άλλες μελέτες επανειλημμένης έκθεσης. Αξιολόγηση της καρκινογενετικότητας πρέπει να πραγματοποιείται μετά τη λήψη αρχικών πληροφοριών για την τοξικότητα μέσω

▼M4

δοκιμών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση. Βραχυπρόθεσμες δοκιμές έναρξης-ανάπτυξης καρκίνου παρέχουν επίσης ενδεχομένως χρήσιμες πληροφορίες. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εφαρμογής μιας κλιμακωτής πειραματικής προσέγγισης για τον έλεγχο της καρκινογενετικότητας στο πλαίσιο της συνολικής αξιολόγησης των ενδεχόμενων δυσμενών επιδράσεων μιας συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην υγεία (16) (17) (18) (19).

9. Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι πλέον κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεδομένου του σχεδιασμού και των στόχων του πειράματος, πριν από την έναρξη της μελέτης. Στα ζητήματα που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη περιλαμβάνονται τα εξής: εάν τα στατιστικά στοιχεία θα πρέπει να περιλαμβάνουν διορθώσεις βάσει της επιβίωσης, ανάλυση των σωρευτικών κινδύνων όγκου σε σχέση με τη διάρκεια επιβίωσης, ανάλυση του χρονικού διαστήματος έως την εμφάνιση όγκου και ανάλυση στην περίπτωση πρόωρου τερματισμού μιας ή περισσότερων ομάδων. Κατευθύνσεις για τις κατάλληλες στατιστικές αναλύσεις και βασικές παραπομπές σε διεθνώς αποδεκτές στατιστικές μεθόδους περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7) και στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 35 για την ανάλυση και την αξιολόγηση μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (20).

10. Κατά τη διεξαγωγή μελέτης καρκινογενετικότητας θα πρέπει να ακολουθούνται πάντα οι κατευθυντήριες αρχές και εκτιμήσεις που περιγράφονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ για την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών ενδείξεων ως λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία για τα χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα στην αξιολόγηση ασφαλείας (21), και ιδίως η παράγραφος 62 του εγγράφου αυτού. Η παράγραφος αυτή αναφέρει ότι «Σε μελέτες που περιλαμβάνουν επανειλημμένες χορηγήσεις, όταν ένα ζώο εμφανίζει κλινικές ενδείξεις που είναι προοδευτικές και οδηγούν σε περαιτέρω επιδείνωση της κατάστασής του, θα πρέπει να λαμβάνεται μια τεκμηριωμένη απόφαση σχετικά με το εάν πρέπει να γίνει ευθανασία στο ζώο ή όχι. Η απόφαση θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη ζητήματα σχετικά με την αξία των πληροφοριών που θα ληφθούν από τη συνέχιση της συμμετοχής του ζώου αυτού στη μελέτη σε σχέση με τη συνολική του κατάσταση. Εάν ληφθεί απόφαση να εξακολουθήσει το ζώο να υποβάλλεται σε δοκιμή, θα πρέπει να αυξάνεται η συχνότητα των παρατηρήσεων, ανάλογα με τις ανάγκες. Επίσης ενδέχεται να διακόπτεται προσωρινά η χορήγηση δόσεων, εάν αυτό θα απαλύνει τον πόνο ή τη δυσφορία, ή να μειώνεται η δόση, εφόσον αυτό δεν επηρεάζει αρνητικά τον σκοπό της δοκιμής.».

11. Λεπτομερής καθοδήγηση σχετικά με τις αρχές επιλογής δόσεων για μελέτες χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας και ανάλυση των αρχών αυτών περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7), καθώς και σε δύο δημοσιεύσεις του International Life Sciences Institute (22) (23). Η βασική στρατηγική επιλογής των δόσεων εξαρτάται από τον πρωταρχικό στόχο (ή τους πρωταρχικούς στόχους) της μελέτης (παράγραφος 6). Κατά την επιλογή κατάλληλων επιπέδων δόσης θα πρέπει να επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ του ελέγχου των κινδύνων αφενός και του χαρακτηρισμού των αποκρίσεων που προκαλούν οι χαμηλές δόσεις και της καταλληλότητάς τους αφετέρου. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό στην περίπτωση που πρόκειται να διεξαχθεί συνδυασμένη μελέτη χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.33 του παρόντος παραρτήματος) (παράγραφος 12).

12. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.33 του παρόντος παραρτήματος) αντί μιας μελέτης χρόνιας τοξικότητας (κεφάλαιο B.30 του παρόντος παραρτήματος) και μιας μελέτης καρκινογενετικότητας (η παρούσα μέθοδος δοκιμών B.32). Η συνδυασμένη δοκιμή προσφέρει μεγαλύτερη αποδοτικότητα ως προς τον χρόνο και το κόστος σε σύγκριση με τη διεξαγωγή δύο χωριστών μελετών, χωρίς να τίθεται σε κίνδυνο η ποιότητα των δεδομένων ούτε στη φάση χρόνιας τοξικότητας ούτε στη φάση καρκινογενετικότητας. Ωστόσο, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στις αρχές επιλογής των δόσεων (παράγραφοι 11 και 22-25) κατά τη διεξαγωγή συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.33 του παρόντος παραρτήματος), ενώ είναι γνωστό επίσης ότι ενδέχεται να απαιτούνται χωριστές μελέτες βάσει ορισμένων κανονιστικών πλαισίων.

▼M4

13. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

14. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά σε διαβαθμισμένες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων για το μεγαλύτερο διάστημα της ζωής τους, συνήθως μέσω της στοματικής οδού. Ενδέχεται να ενδείκνυνται επίσης δοκιμές μέσω της αναπνευστικής οδού ή του δέρματος. Πραγματοποιείται προσεκτική παρατήρηση των ζώων για ενδείξεις τοξικότητας και για την ανάπτυξη νεοπλασματικών αλλοιώσεων. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής νεκροτομούνται, και στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

15. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών καλύπτει κυρίως την εκτίμηση και την αξιολόγηση της καρκινογενετικότητας σε τρωκτικά (παράγραφος 2). Η χρήση άλλων ειδών εκτός των τρωκτικών μπορεί να εξετάζεται όταν τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι τα είδη αυτά έχουν μεγαλύτερη σημασία για την πρόβλεψη των επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία. Η επιλογή του είδους πρέπει να αιτιολογείται. Το προτιμότερο είδος είναι ο επίμυς, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα είδη τρωκτικών, π.χ. ποντικοί. Παρόλο που η χρήση ποντικών σε δοκιμές καρκινογενετικότητας έχει ενδεχομένως περιορισμένη χρησιμότητα (24) (25) (26), βάσει ορισμένων υφιστάμενων κανονιστικών προγραμμάτων εξακολουθούν να απαιτούνται δοκιμές σε ποντικούς, εκτός εάν προσδιοριστεί ότι μια τέτοια δοκιμή δεν είναι απαραίτητη επιστημονικά. Οι επίμυες και οι ποντικοί είναι προτιμώμενα πειραματικά μοντέλα λόγω της σχετικά μικρής διάρκειας ζωής τους, της εκτεταμένης χρήσης τους σε φαρμακολογικές και τοξικολογικές μελέτες, της ευαισθησίας τους στην ογκογένεση, και της διαθεσιμότητας καταλλήλως χαρακτηρισμένων φυλών. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, υπάρχουν διαθέσιμες πολλές πληροφορίες για τη φυσιολογία και την παθολογία τους. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή είδους και φυλής παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7).

16. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Κατά προτίμηση, η μελέτη καρκινογενετικότητας θα πρέπει να διεξάγεται σε ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν σε προκαταρκτική(-ές) μελέτη(-ες) τοξικότητας βραχύτερης διάρκειας, εάν είναι γνωστό ότι ζώα της συγκεκριμένης φυλής και προέλευσης εμφανίζουν προβλήματα εκπλήρωσης των γενικά αποδεκτών κριτηρίων επιβίωσης για πιο μακροπρόθεσμες μελέτες [βλέπε έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7)]. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μιας φυλής ζώων που διαθέτει αποδεκτό ποσοστό επιβίωσης για τη μακροπρόθεσμη μελέτη. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

Στέγαση και διατροφή

17. Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά ή σε κλωβούς σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου· τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά μόνο εάν αυτό αιτιολογείται επιστημονικά (27) (28) (29). Οι κλωβοί διευθετούνται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι οφειλόμενες στη θέση των κλωβών επιδράσεις. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Παρόλο που η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, παρά μόνο κατά τη διάρκεια του καθαρισμού της αίθουσας, τα επιδιωκόμενα επίπεδα της υγρασίας θα πρέπει να είναι 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος να αποτελείται από δώδεκα ώρες φωτός και δώδεκα ώρες σκότους. Όσον αφορά τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με παροχή απεριόριστου πόσιμου νερού. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να ανταποκρίνεται σε όλες τις διατροφικές απαιτήσεις των ειδών που υποβάλλονται στη δοκιμή και η περιεκτικότητα σε τροφικές προσμείξεις, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ

▼M4

άλλων, υπολειμμάτων ζιζανιοκτόνων, ανθεκτικών οργανικών ρύπων, φυτοοιστρογόνων, βαρέων μετάλλων και μυκοτοξινών, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της δοκιμής, θα πρέπει να είναι όσον το δυνατόν μικρότερη. Αναλυτικές πληροφορίες για τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών και τροφικών προσμείξεων θα πρέπει να παρέχονται σε περιοδική βάση, τουλάχιστον στην αρχή της μελέτης και όταν υπάρχει αλλαγή στη χρησιμοποιούμενη παρτίδα και θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση. Θα πρέπει αντίστοιχα να παρέχονται αναλυτικές πληροφορίες για το πόσιμο νερό που χρησιμοποιείται στη μελέτη. Η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη διασφάλισης κατάλληλης πρόσμειξης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και κάλυψης των διατροφικών απαιτήσεων των ζώων, όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μαζί με την τροφή.

Προετοιμασία των ζώων

18. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα, εγκλιματισμένα στις εργαστηριακές συνθήκες για τουλάχιστον 7 ημέρες, τα οποία δεν έχουν υποβληθεί σε άλλες πειραματικές διαδικασίες στο παρελθόν. Στην περίπτωση τρωκτικών, η χορήγηση δόσεων στα ζώα θα πρέπει να ξεκινήσει το συντομότερο δυνατό μετά τον απογαλακτισμό και τον εγκλιματισμό και, κατά προτίμηση, πριν από την ηλικία των 8 εβδομάδων. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να είναι χαρακτηρισμένα ως προς το είδος, τη φυλή, την προέλευση, το φύλο, το βάρος και την ηλικία τους. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων σε κάθε φύλο θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους όλων των ζώων της μελέτης, χωριστά για κάθε φύλο. Τα ζώα πρέπει να κατανέμονται τυχαία σε ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Μετά την τυχαία κατανομή, δεν πρέπει να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο μέσο σωματικό βάρος μεταξύ των ομάδων σε κάθε φύλο. Εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, εάν είναι δυνατό, το στάδιο της τυχαίας κατανομής. Κάθε ζώο πρέπει να λαμβάνει έναν μοναδικό αριθμό αναγνώρισης και να φέρει μόνιμη σήμανση με τον αριθμό αυτό μέσω δερματοστηξίας, εμφυτεύματος μικροτσίπ ή άλλης κατάλληλης μεθόδου.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

19. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα και των δύο φύλων. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκής αριθμός ζώων που να επιτρέπει την ενδελεχή βιολογική και στατιστική αξιολόγηση. Συνεπώς, κάθε ομάδα δόσης και παράλληλη ομάδα-μάρτυρας θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 50 ζώα από κάθε φύλο. Ανάλογα με το στόχο της μελέτης, ενδέχεται να είναι δυνατή η αύξηση της στατιστικής ισχύος των βασικών εκτιμήσεων με διαφορική ανισοκατανομή των ζώων στις διάφορες ομάδες δόσεων, περιλαμβάνοντας περισσότερα από 50 ζώα στις ομάδες χαμηλών δόσεων, π.χ. για την εκτίμηση του δυναμικού καρκινογενετικότητας σε χαμηλές δόσεις. Ωστόσο, αναγνωρίζεται ότι μια μέτρια αύξηση στο μέγεθος των ομάδων συνεπάγεται σχετικά μικρή αύξηση στη στατιστική ισχύ της μελέτης. Περαιτέρω πληροφορίες για το στατιστικό σχεδιασμό της μελέτης και την επιλογή επιπέδων δόσης για τη μεγιστοποίηση της στατιστικής ισχύος παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

Πρόβλεψη για ενδιάμεσες θανατώσεις και δορυφορικές ομάδες (φρουρούς)

20. Η μελέτη ενδέχεται να προβλέπει ενδιάμεσες θανατώσεις, π.χ. τον 12ο μήνα, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την εξέλιξη των νεοπλασματικών αλλοιώσεων και μηχανιστικών πληροφοριών, εφόσον αυτό αιτιολογείται επιστημονικά. Στην περίπτωση που οι πληροφορίες αυτές είναι ήδη διαθέσιμες από προηγούμενες μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση σχετικά με την ελεγχόμενη χημική ουσία, οι ενδιάμεσες θανατώσεις ενδέχεται να μη δικαιολογούνται επιστημονικά. Εάν ο σχεδιασμός της μελέτης περιλαμβάνει ενδιάμεσες θανατώσεις, ο αριθμός των ζώων σε κάθε ομάδα που προγραμματίζεται να θανατωθούν κατά τη διάρκεια της μελέτης είναι συνήθως 10 ζώα ανά φύλο, ενώ ο συνολικός αριθμός ζώων που περιλαμβάνονται στον σχεδιασμό της μελέτης θα πρέπει να αυξάνεται κατά τον αριθμό των ζώων που προγραμματίζεται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Είναι επίσης δυνατόν να περιλαμβάνεται μια πρόσθετη ομάδα ζώων-φρουρών (συνήθως 5 ζώα ανά φύλο) για την παρακολούθηση της κατάστασης ασθενείας, εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης (30). Περαιτέρω κατευθύνσεις περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

▼M4

Ομάδες δόσεων και δοσολογία

21. Καθοδήγηση για όλα τα ζητήματα που αφορούν την επιλογή των δόσεων και το διάστημα που πρέπει να παρεμβάλλεται μεταξύ των δόσεων περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7). Χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον διαφορετικές δόσεις και μια παράλληλη δοκιμασία με μάρτυρες. Τα επίπεδα δόσης θα βασίζονται γενικά στα αποτελέσματα πιο βραχυχρόνιων μελετών με επαναλαμβανόμενη δόση ή μελετών καθορισμού εύρους και θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τυχόν υφιστάμενα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που είναι διαθέσιμα για την ελεγχόμενη χημική ουσία ή για σχετικές χημικές ουσίες.

22. Θα πρέπει να επιλέγεται το μέγιστο επίπεδο δόσης για τον προσδιορισμό των κυρίων οργάνων-στόχου και τοξικών επιδράσεων, χωρίς να προκαλείται πόνος, σοβαρή τοξικότητα, νοσηρότητα ή θάνατος, εκτός εάν οι φυσικοχημικές ιδιότητες και οι βιολογικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θέτουν περιορισμούς. Λαμβάνοντας παράλληλα υπόψη τους παράγοντες που περιγράφονται στην παράγραφο 23 κατωτέρω, το επίπεδο μέγιστης δόσης θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως έτσι ώστε να προκαλεί αποδεδειγμένη τοξικότητα, όπως αυτή μαρτυρείται, παραδείγματος χάριν, από τη μείωση της αύξησης του σωματικού βάρους (κατά περίπου 10 %). Ωστόσο, ανάλογα με τους στόχους της μελέτης (βλέπε παράγραφο 6), ενδέχεται να επιλέγεται ένα ανώτατο επίπεδο δόσης χαμηλότερο από τη δόση που παρέχει αποδεικτικά στοιχεία τοξικότητας, π.χ. εάν μια δόση προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις που προκαλούν προβληματισμό αλλά που επηρεάζουν ελάχιστα τη διάρκεια ζωής ή το βάρος του σώματος.

23. Ενδέχεται να επιλέγονται επίπεδα δόσης και χρονικά διαστήματα μεταξύ των δόσεων ώστε να προσδιορίζεται σχέση δόσης-απόκρισης και, ανάλογα με τον τρόπο δράσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τιμή NOAEL ή άλλο επιδιωκόμενο αποτέλεσμα της μελέτης, π.χ. δόση αναφοράς (BMD) (βλέπε παράγραφο 25) στο ελάχιστο επίπεδο δόσης. Παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον προσδιορισμό των χαμηλότερων δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, η αναμενόμενη κλίση της καμπύλης δόσης-απόκρισης και οι δόσεις στις οποίες ενδέχεται να προκαλούνται σημαντικές αλλαγές στον μεταβολισμό ή στον τρόπο τοξικής δράσης ή οι οποίες αναμένεται να είναι το κατώτατο όριο ή η αφετηρία για παρέκταση σε χαμηλές δόσεις.

24. Το επιλεγόμενο διάστημα μεταξύ των δόσεων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και δεν μπορεί να προβλεφθεί στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, αλλά υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα εξασφαλίζουν συχνά καλές επιδόσεις στη δοκιμή για τον καθορισμό μειούμενων επιπέδων δόσης και η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συνήθως προτιμότερη της χρήσης πολύ μεγάλων διαστημάτων (π.χ. μεγαλύτερων ενός συντελεστή της τάξης του 6-10) μεταξύ των δόσεων. Γενικά θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση συντελεστών μεγαλύτερων του 10, ενώ, όταν χρησιμοποιούνται τέτοιοι συντελεστές, η χρήση τους θα πρέπει να αιτιολογείται.

25. Όπως αναφέρεται περαιτέρω στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 παράγραφος 7, τα σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, τα εξής:

— σημεία μη γραμμικότητας ή σημεία κλίσης στην καμπύλη δόσης-απόκρισης που είναι γνωστά ή για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ύπαρξης,

— τοξικοκινητική και ρύθμιση της δοσολογίας, στην περίπτωση που λαμβάνει ή δεν λαμβάνει χώρα μεταβολική επαγωγή, κορεσμός ή μη γραμμικότητα μεταξύ εξωτερικων και εσωτερικών δόσεων,

— πρόδρομες αλλοιώσεις, δείκτες επίδρασης ή δείκτες της λειτουργίας βασικών υποκείμενων βιολογικών διεργασιών,

— βασικές (ή πιθανολογούμενες) πτυχές του τρόπου δράσης, όπως δόσεις στις οποίες αρχίζει να εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα, διαταράσσονται τα επίπεδα ορμονών, καταβάλλονται οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί κ.λπ.,

▼M4

— περιοχές στην καμπύλη δόσης-απόκρισης στις οποίες απαιτείται μια ιδιαιτέρως αξιόπιστη εκτίμηση, π.χ. στο πεδίο τιμών της αναμενόμενης δόσης αναφοράς ή ενός πιθανολογούμενου κατώτατου ορίου,

— εκτίμηση των αναμενόμενων επιπέδων έκθεσης του ανθρώπου.

26. Οι μάρτυρες είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα προοριζόμενη για τον έλεγχο του φορέα, εφόσον χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Με εξαίρεση τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση με τα ζώα της ομάδας αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται φορέας, ο όγκος φορέα που χορηγείται στους μάρτυρες είναι ο μεγαλύτερος που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής. Εάν μια ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή και προκαλεί σημαντικά μειωμένη πρόσληψη τροφής λόγω μειωμένης γευστικότητας του σιτηρεσίου, τότε ίσως είναι χρήσιμη ως καταλληλότερος μάρτυρας μια επιπλέον ομάδα-μάρτυρας στην οποία χορηγείται το ίδιο σιτηρέσιο.

Παρασκευή των δόσεων και χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

27. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα, με την τροφή ή το πόσιμο νερό ή με καθετήρα. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδών και μεθόδων χορήγησης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7). Η οδός και η μέθοδος χορήγησης εξαρτώνται από τον σκοπό της μελέτης, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τη βιοδιαθεσιμότητά της και την κύρια οδό και μέθοδο έκθεσης του ανθρώπου. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή οδού και μεθόδου χορήγησης. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, η χορήγηση μέσω της στοματικής οδού με καθετήρα θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως μόνο για τους παράγοντες για τους οποίους η συγκεκριμένη οδός και μέθοδος χορήγησης αναμένεται εύλογα να αποτελούν ενδεχόμενο τρόπο έκθεσης του ανθρώπου (π.χ. φαρμακευτικές ουσίες). Διατροφικές ή περιβαλλοντικές χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανιοκτόνων, χορηγούνται συνήθως με την τροφή ή το πόσιμο νερό. Ωστόσο, βάσει ορισμένων σεναρίων, π.χ. έκθεση κατά την εργασία, ενδέχεται να είναι καταλληλότερη η χορήγηση μέσω άλλων οδών.

28. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του φορέα και άλλων προσθέτων, κατά περίπτωση: επιδράσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στον μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, επιδράσεις στις χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, ως πρώτη επιλογή, διαλύματος/γαλακτώματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) κατόπιν, και, ως τελευταία επιλογή, η χρήση διαλύματος σε άλλο φορέα. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, τα τοξικά χαρακτηριστικά του φορέα πρέπει να είναι γνωστά. Πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τη σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την ομοιογένεια των διαλυμάτων ή σιτηρεσίων δόσης (κατά περίπτωση) στις συνθήκες χορήγησης (π.χ. στο σιτηρέσιο).

29. Για τις χημικές ουσίες που χορηγούνται με την τροφή ή το πόσιμο νερό πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες ελεγχόμενης χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Σε μελέτες μακροπρόθεσμης τοξικότητας με χορήγηση με την τροφή, η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά ένα ανώτατο όριο 5 % του συνολικού σιτηρεσίου, ώστε να αποφεύγονται διατροφικές ανισορροπίες. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, πρέπει να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (mg/kg σιτηρεσίου ή ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος του ζώου (mg/kg βάρους σώματος), υπολογιζόμενο σε εβδομαδιαία βάση. Η χρησιμοποιούμενη εναλλακτική επιλογή πρέπει να διευκρινίζεται.

▼M4

30. Στην περίπτωση χορήγησης από το στόμα, χορηγούνται στα ζώα δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθημερινά (επτά ημέρες την εβδομάδα), συνήθως για μια περίοδο 24 μηνών στην περίπτωση τρωκτικών (βλέπε επίσης παράγραφο 32). Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιοδήποτε άλλο καθεστώς δοσολογίας που τυχόν χρησιμοποιείται, π.χ. χορήγηση πέντε ημέρες την εβδομάδα. Στην περίπτωση χορήγησης μέσω του δέρματος, τα ζώα εκτίθενται κανονικά στην ελεγχόμενη χημική ουσία για τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, όπως προσδιορίζεται στο κεφάλαιο Β.9 του παρόντος παραρτήματος (11), για μια περίοδο 24 μηνών. Έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού πραγματοποιείται 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, αλλά ενδέχεται να εφαρμόζεται επίσης έκθεση για 5 ημέρες την εβδομάδα, εφόσον παρέχεται σχετική αιτιολόγηση. Η περίοδος έκθεσης διαρκεί συνήθως 24 μήνες. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Θα πρέπει να παρέχεται αιτιολόγηση στην περίπτωση που εφαρμόζεται διάρκεια έκθεσης μικρότερη των 6 ωρών ημερησίως. Βλέπε επίσης κεφάλαιο Β.8 του παρόντος παραρτήματος (9).

31. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα στα ζώα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται με τη βοήθεια καθετήρα στομάχου ή κατάλληλης διασωλήνωσης, την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα. Συνήθως χορηγείται μία δόση μία φορά την ημέρα, ενώ, στην περίπτωση που μια χημική ουσία έχει τοπική ερεθιστική δράση, μπορεί να διατηρείται η ημερήσια δοσολογία με τη χορήγηση μισών δόσεων (δύο φορές την ημέρα). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος θα πρέπει να διατηρείται στο ελάχιστο εφικτό επίπεδο και δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά το 1 ml / 100 g βάρους σώματος, στην περίπτωση των τρωκτικών (31). Οι διαφορές του όγκου πρέπει να ελαχιστοποιούνται ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης. Εξαίρεση αποτελούν οι ενδεχομένως διαβρωτικές ή ερεθιστικές χημικές ουσίες, οι οποίες θα πρέπει να αραιώνονται ώστε να αποφεύγονται οι σοβαρές τοπικές επιδράσεις. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διεξαγωγή δοκιμών σε συγκεντρώσεις που πιθανόν να αποδειχθούν διαβρωτικές ή ερεθιστικές για το γαστρεντερικό σύστημα.

Διάρκεια της μελέτης

32. Η διάρκεια της μελέτης θα είναι κανονικά 24 μήνες για τα τρωκτικά, ήτοι χρόνος που καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της συνήθους διάρκειας ζωής των χρησιμοποιούμενων ζώων. Ενδέχεται να πραγματοποιούνται μελέτες μικρότερης ή μεγαλύτερης διάρκειας, ανάλογα με τη διάρκεια ζωής της φυλής των χρησιμοποιούμενων ζωικών ειδών, βάσει σχετικής αιτιολόγησης. Στην περίπτωση χρήσης συγκεκριμένων φυλών ποντικών, π.χ. των φυλών AKR/J, C3H/J ή C57BL/6J, ενδέχεται να είναι καταλληλότερο διάστημα μελέτης 18 μηνών. Κατωτέρω παρέχονται ορισμένες κατευθύνσεις σχετικά με τη διάρκεια της μελέτης, τον τερματισμό της και την επιβίωση. Περαιτέρω κατευθύνσεις, συμπεριλαμβανομένων εκτιμήσεων σχετικά με τη δυνατότητα αποδοχής αρνητικής καρκινογενετικότητας σε σχέση με τα δεδομένα επιβίωσης στη μελέτη, περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ για τον σχεδιασμό και τη διεξαγωγή μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (7).

— Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο τερματισμού της μελέτης όταν ο αριθμός των επιζώντων ζώων στις ομάδες με τις χαμηλότερες δόσεις ή στην ομάδα των μαρτύρων φτάσει σε ποσοστά κατώτερα του 25 %.

— Δεν απαιτείται τερματισμός της μελέτης στην περίπτωση που μόνο τα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης πεθάνουν πρόωρα λόγω τοξικότητας.

— Τα δεδομένα επιβίωσης θα πρέπει να εξετάζονται χωριστά για κάθε φύλο.

— Η μελέτη δεν θα πρέπει να επεκτείνεται πέραν του σημείου στο οποίο τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα από τη μελέτη δεν επαρκούν πλέον για την πραγματοποίηση μιας στατιστικά έγκυρης αξιολόγησης.

▼M4

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

33. Θα πρέπει να ελέγχονται όλα τα ζώα, συνήθως στην αρχή και το τέλος κάθε ημέρας, καθώς και τα σαββατοκύριακα και τις αργίες, ώστε να διαπιστώνεται τυχόν νοσηρότητα ή θνησιμότητά τους. Επιπλέον, τα ζώα θα πρέπει να ελέγχονται μία φορά την ημέρα ώστε να διαπιστώνονται συγκεκριμένες ενδείξεις τοξικολογικής σημασίας, λαμβάνοντας υπόψη την περίοδο αιχμής των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση των δόσεων, στην περίπτωση χορήγησης με καθετήρα. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην ανάπτυξη όγκων. Επίσης, θα πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος εμφάνισης, η τοποθεσία, οι διαστάσεις, η μορφή και η πρόοδος κάθε μακροσκοπικά ορατού ή ψηλαφητού όγκου.

Βάρος σώματος, κατανάλωση τροφής και νερού και απόδοση της τροφής

34. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της αγωγής, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση τροφής και η απόδοση της τροφής θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια, στην περίπτωση που η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού. Μετρήσεις της κατανάλωσης ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη στις μελέτες κατά τις οποίες η δραστηριότητα πόσης μπορεί να μεταβληθεί.

Αιματολογικές, βιοχημικές και άλλες εξετάσεις

35. Για να μεγιστοποιούνται οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τη μελέτη, ιδίως σε σχέση με ζητήματα τρόπου δράσης, είναι δυνατόν να λαμβάνονται δείγματα αίματος για αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις, επαφιέμενες στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Ενδέχεται να ενδείκνυται επίσης ανάλυση ούρων. Περαιτέρω κατευθύνσεις για την αξία λήψης των δειγμάτων αυτών στο πλαίσιο μιας μελέτης καρκινογενετικότητας περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7). Εάν θεωρείται σκόπιμο, ενδέχεται να πραγματοποιείται αιμοληψία για αιματολογικές και κλινικές χημικές εξετάσεις και ανάλυση ούρων στο πλαίσιο ενδιάμεσης θανάτωσης (παράγραφος 20) και στον τερματισμό της μελέτης σε 10 ζώα τουλάχιστον ανά φύλο και ανά ομάδα. Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο, π.χ. με καρδιακή παρακέντηση ή από τον οφθαλμικό κόγχο, οπισθοβολβικά, υπό αναισθησία, και αποθηκεύονται, εφόσον ενδείκνυται, υπό κατάλληλες συνθήκες. Μπορούν επίσης να παρασκευάζονται επιχρίσματα αίματος για εξέταση, ιδίως εάν ο μυελός των οστών αποτελεί ενδεχομένως όργανο-στόχο, αν και η αξία της εξέτασης αυτής για την αξιολόγηση του δυναμικού καρκινογενετικότητας/ογκογενετικότητας έχει αμφισβητηθεί (32).

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Νεκροψία

36. Όλα τα ζώα της μελέτης, εκτός των ζώων-φρουρών (βλέπε παράγραφο 20) και άλλων δορυφορικών ζώων, πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ενδέχεται να απαιτείται η διενέργεια νεκροψίας σε ζώα-φρουρούς και άλλα δορυφορικά ζώα κατά περίπτωση, επαφιέμενη στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Το βάρος των οργάνων δεν μετράται συνήθως στο πλαίσιο μελετών καρκινογενετικότητας, καθώς οι αλλαγές λόγω γήρανσης και, σε μεταγενέστερα στάδια, η ανάπτυξη όγκων ανατρέπουν τη χρησιμότητα των δεδομένων βάρους των οργάνων. Ωστόσο, το βάρος των οργάνων ενδέχεται να είναι εξαιρετικά σημαντικό για την αξιολόγηση του βάρους της απόδειξης και ιδίως για εκτιμήσεις του τρόπου δράσης. Οι σχετικές μετρήσεις στο πλαίσιο μιας δορυφορικής μελέτης θα πρέπει να εκτελούνται εντός ενός έτους, το αργότερο, από την έναρξη της μελέτης.

▼**M4**

37. Οι ακόλουθοι ιστοί πρέπει να διατηρούνται στο καταλληλότερο μονιμοποιητικό υλικό, τόσο για τον τύπο ιστού όσο και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης που πρόκειται να ακολουθήσει (33) (οι ιστοί που αναφέρονται εντός αγκύλων διατηρούνται προαιρετικά):

όλες οι μακροσκοπικές βλάβες	καρδιά	πάγκρεας	στόμαχος (προστόμαχος, αδενικό τμήμα στομάχου)
επινεφρίδιος αδένας	ειλεός	παραθυρεοειδής αδένας	[δόντια]
αορτή	νήστις	περιφερειακό νεύρο	όρχις
εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	νεφρός	υπόφυση	Θύμος αδένας
τυφλό έντερο	δακρυγόνος αδένας (εξωβολβικός)	προστάτης	θυρεοειδής
τράχηλος της μήτρας	ήπαρ	ορθό	[γλώσσα]
πηκτικός αδένας	πνεύμονας	σιελογόνος αδένας	τραχεία
κόλον	λεμφαδένες (επιπολής και εν τω βάθει)	σπερματοδόχος κύστη	ουροδόχος κύστη
δωδεκαδάκτυλο	μαστικός αδένας (υποχρεωτικά για θηλυκά ζώα και, εάν μπορεί ορατά να ανατμηθεί, από αρσενικά ζώα)	σκελετικός μυς	μήτρα (συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου της μήτρας)
επιδιδυμίδα	[ανώτερη αναπνευστική οδός, συμπεριλαμβανομένης της μύτης, των κογχών και των παραρρινίων κόλπων]	δέρμα	[ουρητήρας]
οφθαλμός (συμπεριλαμβανομένου του αμφιβληστροειδή)	οισοφάγος	νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)	[ουρήθρα]
[μηριαίο οστό μαζί με την άρθρωση]	[οσφρητικός βολβός]	σπλήνα	κόλπος
χοληδόχος κύστη (για άλλα είδη εκτός του επίμυ)	ωοθήκη	[στέρνο],	τομή του μυελού των οστών και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών
αδένας Harderian			

Στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να διατηρούνται αμφότερα τα όργανα. Βάσει των κλινικών και άλλων ευρημάτων, ενδέχεται να πρέπει να εξεταστούν επιπρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν χορήγηση μέσω του δέρματος, θα πρέπει να διατηρούνται τα όργανα που αναφέρονται στον κατάλογο οργάνων που πρέπει να διατηρούνται σε μελέτες χορήγησης από το στόμα, ενώ απαιτείται επίσης ειδική δειγματοληψία και διατήρηση δέρματος από το σημείο έκθεσης. Σε αναπνευστικές μελέτες, ο κατάλογος των προς διατήρηση και εξέταση ιστών της αναπνευστικής οδού θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις συστάσεις των κεφαλαίων Β.8 και Β.29 του παρόντος παραρτήματος. Στην περίπτωση άλλων οργάνων/ιστών (επιπροσθέτως των συγκεκριμένων ιστών της αναπνευστικής οδού που πρέπει να διατηρούνται), θα πρέπει να εξετάζεται ο κατάλογος οργάνων που παρατίθεται για την περίπτωση μελετών έκθεσης μέσω του στόματος.

▼M4

Ιστοπαθολογία

38. Διατίθεται καθοδήγηση σχετικά με τις βέλτιστες πρακτικές κατά τη διεξαγωγή μελετών τοξικολογικής παθολογίας (33). Εξέταση θα πρέπει να διενεργείται τουλάχιστον στους ακόλουθους ιστούς:

— σε όλους τους ιστούς της ομάδας υψηλής δόσης και της ομάδας των μαρτύρων,

— σε όλους τους ιστούς των ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης,

— σε όλους τους ιστούς που εμφανίζουν μακροσκοπικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένων όγκων,

— όταν παρατηρούνται σχετικές με την αγωγή ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στην ομάδα υψηλής δόσης, πρέπει να εξετάζονται οι ίδιοι ιστοί σε όλα τα ζώα σε όλες τις άλλες ομάδες δόσεων,

— στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να εξετάζονται αμφότερα τα όργανα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Στοιχεία

39. Θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για όλες τις παραμέτρους που αξιολογήθηκαν για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, όλα τα στοιχεία πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα αγωγής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της αγωγής, τον αριθμό των ζώων που ευρέθησαν νεκρά κατά τη διάρκεια της αγωγής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου ή θανάτωσης, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν εκδηλώσεις τοξικότητας, περιγραφή των παρατηρηθέντων τοξικών συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισής τους, της διάρκειας και της σοβαρότητάς τους, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν αλλοιώσεις, το είδος των αλλοιώσεων και το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν καθέναν από τους τύπους αλλοιώσεων. Συνοπτικοί πίνακες στοιχείων θα πρέπει να αναφέρουν τις μέσες και τυπικές αποκλίσεις (όσον αφορά δεδομένα συνεχούς δοκιμής) που διαπιστώθηκαν σε ζώα που εμφάνισαν τοξικές επιδράσεις ή κακώσεις, καθώς και διαβάθμιση των κακώσεων.

40. Ιστορικά δεδομένα ελέγχου ενδέχεται να αποδειχθούν πολύτιμα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης, π.χ. στην περίπτωση που υπάρχουν ενδείξεις ότι τα δεδομένα που προκύπτουν από παράλληλους μάρτυρες αποκλίνουν σημαντικά σε σύγκριση με πρόσφατα δεδομένα από ζώα-μάρτυρες από την ίδια εγκατάσταση ελέγχου/αποικία. Εφόσον έχουν αξιολογηθεί, θα πρέπει να υποβάλλονται ιστορικά δεδομένα ελέγχου από το ίδιο εργαστήριο και να αφορούν ζώα της ίδιας ηλικίας και φυλής, τα οποία έχουν παραχθεί κατά τη διάρκεια των πέντε ετών που προηγήθηκαν της συγκεκριμένης μελέτης.

41. Όταν είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με τη βοήθεια στατιστικής μεθόδου γενικής αποδοχής. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης (παράγραφος 9). Η επιλογή θα πρέπει να προβλέπει διορθώσεις βάσει της επιβίωσης, εφόσον απαιτούνται.

Έκθεση δοκιμής

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

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα ταυτοποίησης,

▼M4

— πηγή χημικής ουσίας,

— αριθμό παρτίδας,

— πιστοποιητικό χημικής ανάλυσης.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Για τα πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της επιλογής,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων στην αρχή της δοκιμής,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφή κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της οδού χορήγησης και της επιλογής δόσης,

— εφόσον έχουν χρησιμοποιηθεί, στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων,

— λεπτομερή στοιχεία για το σκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/παρασκεύασμα του σιτηρεσίου,

— αναλυτικά στοιχεία για τη συγκέντρωση, τη σταθερότητα και την ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— οδός χορήγησης και λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— στην περίπτωση αναπνευστικών μελετών, εάν αφορούσαν ρινική ή ολόσωμη έκθεση,

— πραγματικές δόσεις (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή ή το πόσιμο νερό (mg/kg ή ppm) σε πραγματική δόση, εφόσον είναι εφικτό,

— λεπτομερή στοιχεία σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Αποτελέσματα (θα πρέπει να παρουσιάζονται συνοπτικά δεδομένα σε πίνακα και δεδομένα για το κάθε ζώο)

Γενικά

— δεδομένα επιβίωσης,

— βάρος του σώματος/μεταβολές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής, υπολογισμοί απόδοσης τροφής, εάν έχουν γίνει, και κατανάλωση νερού, κατά περίπτωση,

— τοξικοκινητικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα),

— οφθαλμοσκοπικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα),

— αιματολογικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα),

— κλινικά χημικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα).

▼**M4**

Κλινικά ευρήματα

— ενδείξεις τοξικότητας,

— συχνότητα (και εάν έχει αξιολογηθεί, σοβαρότητα) τυχόν ανωμαλίας,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (εάν είναι παροδικές ή μόνιμες).

Δεδομένα νεκροψίας

— τελικό βάρος σώματος,

— βάρος οργάνων (και λόγος βάρους οργάνων/σώματος, κατά περίπτωση),

— ευρήματα νεκροψίας, συχνότητα και σοβαρότητα ανωμαλιών.

Ιστοπαθολογία

— μη νεοπλασματικά ιστοπαθολογικά ευρήματα,

— νεοπλασματικά ιστοπαθολογικά ευρήματα,

— συσχετισμός μεταξύ των μακροσκοπικών και των μικροσκοπικών ευρημάτων,

— αναλυτική περιγραφή όλων των σχετικών με την αγωγή ιστοπαθολογικών ευρημάτων, συμπεριλαμβανομένων διαβαθμίσεων σοβαρότητας,

— αναφορά τυχόν αξιολόγησης αντικειμενοφόρων από ομοτίμους.

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

— συζήτηση τυχόν προσεγγίσεων μοντελοποίησης,

— σχέσεις δόσης-απόκρισης,

— ιστορικά δεδομένα ελέγχου,

— συνεκτίμηση τυχόν πληροφοριών για τον τρόπο δράσης της ουσίας,

— προσδιορισμό τιμών δόσης αναφοράς, NOAEL ή LOAEL,

— σημασία για τον άνθρωπο.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005), Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, *ATLA* 32: 163-208.

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. et al (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, *Food. Chem. Toxicol.* 40: 145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 437-445.

▼M4

(6) Κεφάλαιο B.27 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή υποχρόνιας τοξικότητας από το στόμα — Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά.

(7) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, διαθέσιμο στον δημόσιο ιστότοπο του ΟΟΣΑ για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών, στη διεύθυνση www.oecd.org/env/testguidelines

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Κεφάλαιο B.8 του παρόντος παραρτήματος: Υποξεία αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 28 ημερών.

(10) Κεφάλαιο B.29 του παρόντος παραρτήματος: Υποχρόνια αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 90 ημερών.

(11) Κεφάλαιο B.9 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα επαναλαμβανόμενης (28 ημέρες) δόσης (δερματική).

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006), IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans, *Crit. Rev. in Toxicol*. 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., και Fenner-Crisp P.A. (2003), The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview, *Crit. Rev. Toxicol.* 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006), Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk, *Toxicol. Sci.* 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003), A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action, *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. et al (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. et al (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. et al (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. et al (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.

(20) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼**M4**

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection, *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729-837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays, Foran JA (Ed.), ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. και Lumley C.E. (1994), The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals, *The Toxicologist* 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A. και Lumley C.E. (1996), The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals, στο D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds), Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation, Queen's University Press, Belfast, pp. 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997), The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry, *Environ Health Perspect.* 105:1196-1203.

(27) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33).

(28) National Research Council (1985), Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments, ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.

(32) Weingand K., et al. (1996), Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 29: 198-201.

(33) Crissman J., Goodman D., Hildebrandt P., et al. (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology, *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M4

Β.33. ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ/ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 453 του ΟΟΣΑ (2009). Η αρχική TG 453 εκδόθηκε το 1981. Θεωρήθηκε απαραίτητο να αναπτυχθεί η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών Β.33 ώστε να αντανακλά τις πλέον πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της καλής μεταχείρισης των ζώων και τις κανονιστικές απαιτήσεις (1) (2) (3) (4) (5). Η επικαιροποίηση της παρούσας μεθόδου δοκιμών Β.33 διενεργήθηκε παράλληλα με τις αναθεωρήσεις του κεφαλαίου Β.32 «Μελέτες καρκινογενετικότητας» και του κεφαλαίου Β.30 «Μελέτες χρόνιας τοξικότητας» του παρόντος παραρτήματος, με στόχο τη λήψη πρόσθετων πληροφοριών από τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και την παροχή περαιτέρω λεπτομερών στοιχείων για την επιλογή των δόσεων. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί ώστε να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ενός ευρέος φάσματος χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων φυτοφαρμάκων και βιομηχανικών χημικών ουσιών. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες λεπτομέρειες και απαιτήσεις ενδέχεται να διαφέρουν στην περίπτωση φαρμακευτικών ουσιών [βλέπε καθοδήγηση S1B της Διεθνούς διάσκεψης Εναρμόνισης (ICH) για τον έλεγχο της καρκινογενετικότητας φαρμακευτικών ουσιών].

2. Στην πλειονότητά τους, οι μελέτες χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας διεξάγονται σε είδη τρωκτικών. Επομένως και η παρούσα μέθοδος δοκιμών προορίζεται να εφαρμόζεται κυρίως σε μελέτες διεξαγόμενες με αυτά τα είδη. Εάν απαιτείται η διεξαγωγή τέτοιων μελετών σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, μπορούν επίσης να εφαρμόζονται οι περιγραφόμενες αρχές και διαδικασίες, με κατάλληλες τροποποιήσεις, μαζί με αυτές που περιγράφονται στο κεφάλαιο Β.27 «Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά» του παρόντος παραρτήματος (6), όπως περιγράφεται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ για τον σχεδιασμό και τη διεξαγωγή μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (7).

3. Οι τρεις βασικές οδοί χορήγησης ουσιών που χρησιμοποιούνται σε μελέτες χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας είναι μέσω του στόματος, μέσω του δέρματος και μέσω της εισπνοής. Η επιλογή οδού χορήγησης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την κύρια οδό έκθεσης του ανθρώπου. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδού έκθεσης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εστιάζει στην έκθεση μέσω της στοματικής οδού, της συνηθέστερα χρησιμοποιούμενης οδού στις μελέτες χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας. Παρόλο που οι μακροπρόθεσμες μελέτες που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω του δέρματος ή της αναπνευστικής οδού ενδέχεται να είναι επίσης απαραίτητες για την εκτίμηση των κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία και/ή ενδέχεται να απαιτούνται βάσει συγκεκριμένων κανονιστικών καθεστώτων, αμφότερες οι οδοί έκθεσης είναι τεχνικά πολύπλοκες σε σημαντικό βαθμό. Παρόλο που οι μελέτες αυτές θα πρέπει να σχεδιάζονται κατά περίπτωση, η μέθοδος δοκιμών που περιγράφεται στο κεφάλαιο αυτό για την εκτίμηση και την αξιολόγηση της χρόνιας τοξικότητας και της καρκινογενετικότητας που προκαλούνται με χορήγηση από το στόμα θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση ενός πρωτοκόλλου για αναπνευστικές και/ή δερματικές μελέτες όσον αφορά συστάσεις για περιόδους αγωγής, κλινικές και παθολογικές παραμέτρους κ.λπ. Ο ΟΟΣΑ έχει εκδώσει έγγραφα καθοδήγησης σχετικά με τη χορήγηση ελεγχόμενων χημικών ουσιών μέσω της αναπνευστικής οδού (7)(8) και του δέρματος (7). Τα κεφάλαια Β.8 (9) και Β.29 (10) του παρόντος παραρτήματος, καθώς και το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (8), θα πρέπει να λαμβάνονται ιδιαιτέρως υπόψη κατά τον σχεδιασμό πιο μακροπρόθεσμων μελετών που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού. Το κεφάλαιο Β.9 του παρόντος παραρτήματος (11) θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαιτέρως υπόψη στην περίπτωση δοκιμών μέσω του δέρματος.

▼M4

5. Η συνδυασμένη μελέτη χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους για την υγεία που ενδέχεται να προκύπτουν από επανειλημμένη έκθεση έως και για ολόκληρη τη διάρκεια ζωής του χρησιμοποιούμενου είδους. Η μελέτη παρέχει πληροφορίες για τις τοξικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής καρκινογενετικότητας, για ενδεχόμενα όργανα στόχο και για την πιθανότητα συσσώρευσης. Παρέχει εκτίμηση του μέγιστου επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς τοξικές επιδράσεις και, στην περίπτωση μη γονιδιοτοξικών καρκινογόνων, αποκρίσεις εμφάνισης όγκου, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση του ανθρώπου. Τονίζεται επίσης η ανάγκη προσεκτικής κλινικής παρατήρησης των πειραματόζωων προκειμένου να ληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες.

6. Οι στόχοι των μελετών χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας που καλύπτονται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνουν:

— τον προσδιορισμό των καρκινογόνων ιδιοτήτων μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας οι οποίες προκαλούν αυξημένη συχνότητα νεοπλασμάτων, αυξημένο ποσοστό κακοηθών νεοπλασμάτων ή μείωση του χρόνου που μεσολαβεί έως την εμφάνιση νεοπλασμάτων, σε σύγκριση με δοκιμασίες με παράλληλες ομάδες-μάρτυρες,

— τον προσδιορισμό του χρόνου που μεσολαβεί έως την εμφάνιση νεοπλασμάτων,

— τον προσδιορισμό της χρόνιας τοξικότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— τον προσδιορισμό οργάνων-στόχου χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας,

— τον χαρακτηρισμό της σχέσης δόσης-απόκρισης,

— τον προσδιορισμό του επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL) ή της αφετηρίας για τον καθορισμό δόσης αναφοράς (BMD),

— την παρέκταση των καρκινογόνων επιδράσεων στην έκθεση του ανθρώπου σε χαμηλά επίπεδα δόσης,

— την πρόβλεψη επιδράσεων χρόνιας τοξικότητας στα επίπεδα έκθεσης του ανθρώπου,

— την παροχή δεδομένων για τον έλεγχο υποθέσεων σχετικά με τον τρόπο δράσης (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Κατά την εκτίμηση και την αξιολόγηση της ενδεχόμενης καρκινογενετικότητας και χρόνιας τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, το πειραματικό εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, ώστε να εστιάζεται ο σχεδιασμός στον πλέον αποδοτικό έλεγχο των τοξικολογικών ιδιοτήτων της ουσίας και να ελαχιστοποιείται η χρήση των ζώων. Οι πληροφορίες και η μελέτη του τρόπου δράσης μιας ουσίας για την οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι καρκινογόνος (2) (7) (12) (13) (14) (15) είναι ιδιαιτέρως σημαντικές, δεδομένου ότι ο βέλτιστος σχεδιασμός ενδέχεται να διαφέρει ανάλογα με το εάν είναι γνωστό ή υπάρχουν υπόνοιες ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι γονιδιοτοξική καρκινογόνος ουσία. Περαιτέρω κατευθύνσεις για ζητήματα σχετικά με τον τρόπο δράσης περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

8. Πληροφορίες που θα βοηθήσουν στον σχεδιασμό της μελέτης είναι, μεταξύ άλλων, η ταυτότητα, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας· τυχόν πληροφορίες για τον τρόπο δράσης· τα αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας *in vitro* ή *in vivo*, συμπεριλαμβανομένων δοκιμών γονιδιοτοξικότητας· οι προβλεπόμενες χρήσεις και η δυνητική έκθεση του ανθρώπου· τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR, δεδομένα μεταλλαξιγένεσης/γονιδιοτοξικότητας, καρκινογενετικότητας και άλλα τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς χημικές ουσίες· διαθέσιμα τοξικοκινητικά δεδομένα (κινητική μονής δόσης και επίσης επαναλαμβανόμενης δόσης, εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα τέτοια δεδομένα) και δεδομένα

▼M4

που προέρχονται από άλλες μελέτες επανειλημμένης έκθεσης. Ο προσδιορισμός της χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας πρέπει να πραγματοποιείται μόνο μετά τη λήψη αρχικών πληροφοριών για την τοξικότητα μέσω δοκιμών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση. Βραχυπρόθεσμες δοκιμές έναρξης-ανάπτυξης καρκίνου παρέχουν επίσης ενδεχομένως χρήσιμες πληροφορίες. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εφαρμογής μιας κλιμακωτής πειραματικής προσέγγισης για τον έλεγχο της καρκινογενετικότητας στο πλαίσιο της συνολικής αξιολόγησης των ενδεχόμενων δυσμενών επιδράσεων μιας συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην υγεία (16) (17) (18) (19).

9. Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι πλέον κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεδομένου του σχεδιασμού και των στόχων του πειράματος, πριν από την έναρξη της μελέτης. Στα ζητήματα που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη περιλαμβάνονται τα εξής: εάν τα στατιστικά στοιχεία θα πρέπει να περιλαμβάνουν διορθώσεις βάσει της επιβίωσης, ανάλυση των σωρευτικών κινδύνων όγκου σε σχέση με τη διάρκεια επιβίωσης, ανάλυση του χρονικού διαστήματος έως την εμφάνιση όγκου και ανάλυση στην περίπτωση πρόωρου τερματισμού μιας ή περισσότερων ομάδων. Κατευθύνσεις για τις κατάλληλες στατιστικές αναλύσεις και βασικές παραπομπές σε διεθνώς αποδεκτές στατιστικές μεθόδους περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7) και στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 35 για την ανάλυση και την αξιολόγηση μελετών χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (20).

10. Κατά τη διεξαγωγή μελέτης καρκινογενετικότητας θα πρέπει να ακολουθούνται πάντα οι κατευθυντήριες αρχές και εκτιμήσεις που περιγράφονται στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών ενδείξεων ως λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία για τα χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα στην αξιολόγηση ασφαλείας (21), και ιδίως η παράγραφος 62 του εγγράφου αυτού. Η παράγραφος αυτή αναφέρει ότι «Σε μελέτες που περιλαμβάνουν επανειλημμένες χορηγήσεις, όταν ένα ζώο εμφανίζει κλινικές ενδείξεις που είναι προοδευτικές και οδηγούν σε περαιτέρω επιδείνωση της κατάστασής του, θα πρέπει να λαμβάνεται μια τεκμηριωμένη απόφαση σχετικά με το εάν πρέπει να γίνει ευθανασία στο ζώο ή όχι. Η απόφαση θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη ζητήματα σχετικά με την αξία των πληροφοριών που θα ληφθούν από τη συνέχιση της συμμετοχής του ζώου αυτού στη μελέτη σε σχέση με τη συνολική του κατάσταση. Εάν ληφθεί απόφαση να εξακολουθήσει το ζώο να υποβάλλεται σε δοκιμή, θα πρέπει να αυξάνεται η συχνότητα των παρατηρήσεων, ανάλογα με τις ανάγκες. Επίσης ενδέχεται να διακόπτεται προσωρινά η χορήγηση δόσεων, εάν αυτό θα απαλύνει τον πόνο ή τη δυσφορία, ή να μειώνεται η δόση, εφόσον αυτό δεν επηρεάζει αρνητικά τον σκοπό της δοκιμής.».

11. Λεπτομερής καθοδήγηση σχετικά με τις αρχές επιλογής δόσεων για μελέτες χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας και ανάλυση τνω αρχών αυτών περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7), καθώς και σε δύο δημοσιεύσεις του International Life Sciences Institute (22) (23). Η βασική στρατηγική επιλογής των δόσεων εξαρτάται από τον πρωταρχικό στόχο (ή τους πρωταρχικούς στόχους) της μελέτης (παράγραφος 6). Κατά την επιλογή κατάλληλων επιπέδων δόσης θα πρέπει να επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ του ελέγχου των κινδύνων αφενός και του χαρακτηρισμού των αποκρίσεων που προκαλούν οι χαμηλές δόσεις και της καταλληλότητάς τους αφετέρου. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό στην περίπτωση της παρούσας συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας.

12. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής της παρούσας συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας αντί μιας μελέτης χρόνιας τοξικότητας (κεφάλαιο Β.30 του παρόντος παραρτήματος) και μιας μελέτης καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο Β.32 του παρόντος παραρτήματος). Η συνδυασμένη δοκιμή προσφέρει μεγαλύτερη αποδοτικότητα ως προς τον χρόνο και το κόστος, καθώς και μείωση του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται, σε σύγκριση με τη διεξαγωγή δύο χωριστών μελετών, χωρίς να τίθενται σε κίνδυνο η ποιότητα των δεδομένων ούτε στη φάση χρόνιας τοξικότητας ούτε στη φάση καρκινογενετικότητας. Ωστόσο, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στις αρχές επιλογής των δόσεων (παράγραφοι 11 και 22-26) κατά τη διεξαγωγή συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας, ενώ είναι γνωστό επίσης ότι ενδέχεται να απαιτούνται χωριστές μελέτες βάσει ορισμένων κανονιστικών πλαισίων. Περαιτέρω κατευθύνσεις σχετικά με τον σχεδιασμό της συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας ώστε να επιτυγχάνεται μέγιστη αποδοτικότητα της μελέτης όσον αφορά τις δυνατότητες μείωσης του αριθμού των χρησιμοποιούμενων ζώων, καθώς και μέσω του εξορθολογισμού των διαφόρων πειραματικών διαδικασιών, περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

▼M4

13. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρατίθενται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου και στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

14. Ο σχεδιασμός της μελέτης αποτελείται από δύο παράλληλες φάσεις, μία φάση χρόνιας τοξικότητας και μία φάση καρκινογενετικότητας (όσον αφορά τη διάρκεια κάθε φάσης, βλέπε παραγράφους 34 και 35, αντιστοίχως). Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα, αν και μπορεί να είναι επίσης κατάλληλη η δοκιμή μέσω της αναπνευστικής οδού ή του δέρματος. Κατά τη φάση χρόνιας τοξικότητας, η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά σε διαβαθμισμένες δόσεις σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων, με ένα επίπεδο δόσης ανά ομάδα, συνήθως για περίοδο 12 μηνών, αν και μπορούν να επιλεγούν μεγαλύτερες ή μικρότερες περίοδοι, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις (βλέπε παράγραφο 34). Η διάρκεια αυτή επιλέγεται να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να επιτρέπει την εκδήλωση τυχόν επιδράσεων σωρευτικής τοξικότητας, χωρίς να προκαλείται σύγχυση από τυχόν αλλαγές οφειλόμενες στη γήρανση. Ο σχεδιασμός της μελέτης μπορεί να περιλαμβάνει επίσης μία ή περισσότερες ενδιάμεσες θανατώσεις, π.χ. κατά τον 3ο και τον 6ο μήνα, και πρόσθετες ομάδες ζώων για τον σκοπό αυτό (βλέπε παράγραφο 20). Κατά τη φάση καρκινογενετικότητας, η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων για ένα σημαντικό διάστημα της διάρκειας ζωής τους. Πραγματοποιείται προσεκτική παρατήρηση των ζώων κατά τη διάρκεια και των δύο φάσεων για ενδείξεις τοξικότητας και για τυχόν ανάπτυξη νεοπλασματικών αλλοιώσεων. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής νεκροτομούνται, και στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

15. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών καλύπτει κυρίως την εκτίμηση και την αξιολόγηση της χρόνιας τοξικότητας και της καρκινογενετικότητας σε τρωκτικά (παράγραφος 2). Η χρήση άλλων ειδών εκτός των τρωκτικών μπορεί να εξετάζεται όταν τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι τα είδη αυτά έχουν μεγαλύτερη σημασία για την πρόβλεψη των επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία. Η επιλογή του είδους πρέπει να αιτιολογείται. Το προτιμότερο είδος είναι ο επίμυς, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα είδη τρωκτικών, π.χ. ποντικοί. Παρόλο που η χρήση ποντικών σε δοκιμές καρκινογενετικότητας έχει ενδεχομένως περιορισμένη χρησιμότητα (24) (25) (26), βάσει ορισμένων υφιστάμενων κανονιστικών προγραμμάτων εξακολουθούν να απαιτούνται δοκιμές σε ποντικούς, εκτός εάν προσδιοριστεί ότι μια τέτοια δοκιμή δεν είναι απαραίτητη επιστημονικά. Οι επίμυες και οι ποντικοί είναι προτιμώμενα πειραματικά μοντέλα λόγω της σχετικά μικρής διάρκειας ζωής τους, της εκτεταμένης χρήσης τους σε φαρμακολογικές και τοξικολογικές μελέτες, της ευαισθησίας τους στην ογκογένεση και της διαθεσιμότητας καταλλήλως χαρακτηρισμένων φυλών. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, υπάρχουν διαθέσιμες πολλές πληροφορίες για τη φυσιολογία και την παθολογία τους. Ο σχεδιασμός και η διεξαγωγή μελετών χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, όταν απαιτούνται τέτοιες μελέτες, θα πρέπει να βασίζονται στις αρχές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, καθώς και στις αρχές του κεφαλαίου Β.27 «Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά» του παρόντος παραρτήματος (6). Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή είδους και φυλής παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7).

16. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Κατά προτίμηση, η συνδυασμένη μελέτη χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας θα πρέπει να διεξάγεται σε ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν σε προκαταρκτική(-ές) μελέτη(-ες) τοξικότητας βραχύτερης διάρκειας, εάν είναι γνωστό ότι ζώα της συγκεκριμένης φυλής και προέλευσης εμφανίζουν προβλήματα εκπλήρωσης των γενικά αποδεκτών κριτηρίων επιβίωσης για πιο μακροπρόθεσμες μελέτες [βλέπε έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7)]. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μιας φυλής ζώων που διαθέτει αποδεκτό ποσοστό επιβίωσης για τη μακροπρόθεσμη μελέτη. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

▼M4

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

17. Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά ή σε κλωβούς σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου· τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά μόνο εάν αυτό αιτιολογείται επιστημονικά (27) (28) (29). Οι κλωβοί διευθετούνται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι οφειλόμενες στη θέση των κλωβών επιδράσεις. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C). Παρόλο που η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, παρά μόνο κατά τη διάρκεια του καθαρισμού της αίθουσας, τα επιδιωκόμενα επίπεδα της υγρασίας θα πρέπει να είναι 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος να αποτελείται από δώδεκα ώρες φωτός και δώδεκα ώρες σκότους. Όσον αφορά τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με παροχή απεριόριστου πόσιμου νερού. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να ανταποκρίνεται σε όλες τις διατροφικές απαιτήσεις των ειδών που υποβάλλονται στη δοκιμή και η περιεκτικότητα σε τροφικές προσμείξεις, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, υπολειμμάτων ζιζανιοκτόνων, ανθεκτικών οργανικών ρύπων, φυτοοιστρογόνων, βαρέων μετάλλων και μυκοτοξινών, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της δοκιμής, θα πρέπει να είναι όσον το δυνατόν μικρότερη. Αναλυτικές πληροφορίες για τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών και τροφικών προσμείξεων θα πρέπει να παρέχονται σε περιοδική βάση, τουλάχιστον στην αρχή της μελέτης και όταν υπάρχει αλλαγή στη χρησιμοποιούμενη παρτίδα και θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση. Θα πρέπει αντίστοιχα να παρέχονται αναλυτικές πληροφορίες για το πόσιμο νερό που χρησιμοποιείται στη μελέτη. Η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη διασφάλισης κατάλληλης πρόσμειξης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και κάλυψης των διατροφικών απαιτήσεων των ζώων, όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μαζί με την τροφή.

Προετοιμασία των ζώων

18. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα, εγκλιματισμένα στις εργαστηριακές συνθήκες για τουλάχιστον 7 ημέρες, τα οποία δεν έχουν υποβληθεί σε άλλες πειραματικές διαδικασίες στο παρελθόν. Στην περίπτωση τρωκτικών, η χορήγηση δόσεων στα ζώα θα πρέπει να ξεκινήσει το συντομότερο δυνατό μετά τον απογαλακτισμό και τον εγκλιματισμό και, κατά προτίμηση, πριν από την ηλικία των 8 εβδομάδων. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να είναι χαρακτηρισμένα ως προς το είδος, τη φυλή, την προέλευση, το φύλο, το βάρος και την ηλικία τους. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων σε κάθε φύλο θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους όλων των ζώων της μελέτης, χωριστά για κάθε φύλο. Τα ζώα πρέπει να κατανέμονται τυχαία σε ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Μετά την τυχαία κατανομή, δεν πρέπει να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο μέσο σωματικό βάρος μεταξύ των ομάδων σε κάθε φύλο. Εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, εάν είναι δυνατό, το στάδιο της τυχαίας κατανομής. Κάθε ζώο πρέπει να λαμβάνει έναν μοναδικό αριθμό αναγνώρισης και να φέρει μόνιμη σήμανση με τον αριθμό αυτό μέσω δερματοστηξίας, εμφυτεύματος μικροτσίπ ή άλλης κατάλληλης μεθόδου.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

19. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα και των δύο φύλων. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκής αριθμός ζώων που να επιτρέπει την ενδελεχή βιολογική και στατιστική αξιολόγηση. Στην περίπτωση τρωκτικών, κάθε ομάδα δόσης (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 22) και κάθε παράλληλη ομάδα-μάρτυρας που προορίζεται για τη φάση καρκινογενετικότητας της μελέτης θα πρέπει, επομένως, να περιέχει τουλάχιστον 50 ζώα από κάθε φύλο. Ανάλογα με το στόχο της μελέτης, ενδέχεται να είναι δυνατή η αύξηση της στατιστικής ισχύος των βασικών εκτιμήσεων με διαφορική ανισοκατανομή των ζώων στις διάφορες ομάδες δόσεων, περιλαμβάνοντας περισσότερα από 50 ζώα στις ομάδες χαμηλών δόσεων, π.χ. για την εκτίμηση του δυναμικού καρκινογενετικότητας σε χαμηλές δόσεις. Ωστόσο, αναγνωρίζεται ότι μια μέτρια αύξηση στο μέγεθος των ομάδων συνεπάγεται σχετικά μικρή αύξηση στη στατιστική ισχύ της μελέτης. Κάθε ομάδα δόσης (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 22) και κάθε παράλληλη ομάδα-μάρτυρας που προορίζεται

▼M4

για τη φάση χρόνιας τοξικότητας της μελέτης θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 10 ζώα από κάθε φύλο, στην περίπτωση που στη μελέτη χρησιμοποιούνται τρωκτικά. Επισημαίνεται ότι ο αριθμός αυτός είναι μικρότερος από τον αριθμό των ζώων στη μελέτη χρόνιας τοξικότητας (κεφάλαιο B.30 του παρόντος παραρτήματος). Η ερμηνεία των δεδομένων από τον μειωμένο αριθμό ζώων ανά ομάδα στη φάση χρόνιας τοξικότητας της παρούσας συνδυασμένης μελέτης στηρίζεται επίσης στα δεδομένα από τον μεγαλύτερο αριθμό ζώων στη φάση καρκινογενετικότητας της μελέτης. Σε μελέτες με ποντικούς, ενδέχεται να απαιτούνται επιπλέον ζώα σε κάθε ομάδα δόσης, κατά τη φάση χρόνιας τοξικότητας, για τη διεξαγωγή όλων των απαιτούμενων αιματολογικών εξετάσεων. Περαιτέρω πληροφορίες για το στατιστικό σχεδιασμό της μελέτης και την επιλογή επιπέδων δόσης για τη μεγιστοποίηση της στατιστικής ισχύος παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

Πρόβλεψη για ενδιάμεσες θανατώσεις, δορυφορική ομάδα και ζώα-φρουρούς

20. Η μελέτη ενδέχεται να προβλέπει ενδιάμεσες θανατώσεις, π.χ. τον 6ο μήνα κατά τη φάση χρόνιας τοξικότητας, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την εξέλιξη των μη νεοπλασματικών αλλοιώσεων και μηχανιστικών πληροφοριών, εφόσον αυτό αιτιολογείται επιστημονικά. Στην περίπτωση που οι πληροφορίες αυτές είναι ήδη διαθέσιμες από προηγούμενες μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση σχετικά με την ελεγχόμενη χημική ουσία, οι ενδιάμεσες θανατώσεις ενδέχεται να μην δικαιολογούνται επιστημονικά. Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στη φάση χρόνιας τοξικότητας της μελέτης, συνήθως διάρκειας 12 μηνών (παράγραφος 34), παρέχουν στοιχεία ενδιάμεσης θανάτωσης για τη φάση καρκινογενετικότητας της μελέτης, επιτυγχάνοντας έτσι μείωση στον αριθμό των ζώων που χρησιμοποιούνται συνολικά. Είναι επίσης δυνατόν να περιλαμβάνονται δορυφορικές ομάδες στη φάση χρόνιας τοξικότητας της μελέτης ώστε να παρακολουθείται η αναστρεψιμότητα τυχόν τοξικολογικών αλλαγών που προκαλεί η ελεγχόμενη χημική ουσία. Οι ομάδες αυτές μπορούν να περιορίζονται στο επίπεδο μέγιστης δόσης της μελέτης συν τους μάρτυρες. Είναι επίσης δυνατόν να περιλαμβάνεται μια πρόσθετη ομάδα ζώων-φρουρών (συνήθως 5 ζώα ανά φύλο) για την παρακολούθηση της κατάστασης ασθενείας, εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης (30). Περαιτέρω καθοδήγηση ώστε ο σχεδιασμός της μελέτης να περιλαμβάνει ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, δορυφορικά ζώα και ζώα-φρουρούς και, παράλληλα να ελαχιστοποιείται ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιούνται συνολικά, περιέχεται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7).

21. Εάν ο σχεδιασμός της μελέτης περιλαμβάνει δορυφορικά ζώα και/ή ενδιάμεσες θανατώσεις, ο αριθμός των ζώων που κάθε ομάδα δόσης περιλαμβάνει για τον σκοπό αυτό είναι συνήθως 10 ζώα ανά φύλο, ενώ ο συνολικός αριθμός ζώων που περιλαμβάνονται στον σχεδιασμό της μελέτης θα πρέπει να αυξάνεται κατά τον αριθμό των ζώων που προγραμματίζεται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Τα ζώα που θανατώνονται κατά τη διάρκεια της μελέτης και τα δορυφορικά ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται κανονικά στις ίδιες παρατηρήσεις σχετικά, μεταξύ άλλων, με το σωματικό βάρος τους, την κατανάλωση τροφής/νερού, αιματολογικές μετρήσεις και μετρήσεις κλινικής βιοχημείας και παθολογικές εξετάσεις με αυτές στις οποίες υποβάλλονται τα ζώα στη φάση χρόνιας τοξικότητας της κυρίως μελέτης. Ωστόσο, ενδέχεται να γίνεται πρόβλεψη (στις ομάδες ενδιάμεσης θανάτωσης) για τον περιορισμό των μετρήσεων σε συγκεκριμένες, βασικές μετρήσεις, όπως σχετικά με τη νευροτοξικότητα ή την ανοσοτοξικότητα.

Ομάδες δόσεων και δοσολογία

22. Κατευθύνσεις για όλα τα ζητήματα που αφορούν την επιλογή των δόσεων και το διάστημα που πρέπει να παρεμβάλλεται μεταξύ των δόσεων περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7). Πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσης και μια παράλληλη ομάδα-μάρτυρας, για αμφότερες τις φάσεις χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας. Τα επίπεδα δόσης θα βασίζονται γενικά στα αποτελέσματα πιο βραχυπρόθεσμων μελετών με επαναλαμβανόμενη δόση ή μελετών καθορισμού εύρους και θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τυχόν υφιστάμενα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που είναι διαθέσιμα για την ελεγχόμενη χημική ουσία ή για σχετικές χημικές ουσίες.

▼M4

23. Για τη φάση χρόνιας τοξικότητας της μελέτης, ενδέχεται να μην θεωρείται απαραίτητη μια πλήρης μελέτη με τρία επίπεδα δόσεων, αν αναμένεται ότι μία δοκιμή σε ένα επίπεδο δόσης, ισοδύναμης με τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, δεν είναι πιθανό να προκαλέσει αρνητικές συνέπειες. Η απόφαση αυτή θα πρέπει να βασίζεται σε πληροφορίες από προκαταρκτικές μελέτες και σε εκτίμηση ότι δεν αναμένεται να προκληθεί τοξικότητα, βάσει δεδομένων από χημικές ουσίες παρόμοιας δομής. Μπορεί να εφαρμόζεται όριο 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, εκτός εάν από την έκθεση του ανθρώπου προκύψει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλοτέρου επίπεδου δόσης.

24. Θα πρέπει να επιλέγεται το μέγιστο επίπεδο δόσης για τον προσδιορισμό των κυρίων οργάνων-στόχου και τοξικών επιδράσεων, χωρίς να προκαλείται πόνος, σοβαρή τοξικότητα, νοσηρότητα ή θάνατος, εκτός εάν οι φυσικοχημικές ιδιότητες και οι βιολογικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θέτουν περιορισμούς. Το επίπεδο μέγιστης δόσης θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως έτσι ώστε να προκαλεί αποδεδειγμένη τοξικότητα, όπως αυτή μαρτυρείται, παραδείγματος χάριν, από τη μείωση της αύξησης του σωματικού βάρους (κατά περίπου 10 %). Ωστόσο, ανάλογα με τους στόχους της μελέτης (βλέπε παράγραφο 6), ενδέχεται να επιλέγεται ένα ανώτατο επίπεδο δόσης χαμηλότερο από τη δόση που παρέχει αποδεικτικά στοιχεία τοξικότητας, π.χ. εάν μια δόση προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις που προκαλούν προβληματισμό αλλά που επηρεάζουν ελάχιστα τη διάρκεια ζωής ή το βάρος του σώματος.

25. Ενδέχεται να επιλέγονται επίπεδα δόσης και χρονικά διαστήματα μεταξύ των δόσεων ώστε να προσδιορίζεται σχέση δόσης-απόκρισης και, ανάλογα με τον τρόπο δράσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τιμή NOAEL ή άλλο επιδιωκόμενο αποτέλεσμα της μελέτης, π.χ. δόση αναφοράς (BMD) (βλέπε παράγραφο 27). Παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον προσδιορισμό των χαμηλότερων δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, η αναμενόμενη κλίση της καμπύλης δόσης-απόκρισης και οι δόσεις στις οποίες ενδέχεται να προκαλούνται σημαντικές αλλαγές στον μεταβολισμό ή στον τρόπο τοξικής δράσης ή οι οποίες αναμένεται να είναι το κατώτατο όριο ή η αφετηρία για παρέκταση σε χαμηλές δόσεις. Κατά τη διεξαγωγή συνδυασμένης μελέτης καρκινογενετικότητας/χρόνιας τοξικότητας, κύριος στόχος είναι η λήψη πληροφοριών για την εκτίμηση του κινδύνου καρκινογενετικότητας, ενώ η λήψη πληροφοριών για τη χρόνια τοξικότητα αποτελεί συνήθως δευτερεύοντα στόχο. Αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την επιλογή επιπέδων δόσεων και χρονικών διαστημάτων μεταξύ των δόσεων για τη μελέτη.

26. Το επιλεγόμενο διάστημα μεταξύ των δόσεων εξαρτάται από τους στόχους της μελέτης και τα χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και δεν μπορεί να προβλεφθεί λεπτομερώς στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, αλλά υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα εξασφαλίζουν συχνά καλές επιδόσεις στη δοκιμή όταν χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό μειούμενων επιπέδων δόσης και η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συνήθως προτιμότερη της χρήσης πολύ μεγάλων διαστημάτων (π.χ. μεγαλύτερων ενός συντελεστή της τάξης του 6-10) μεταξύ των δόσεων. Γενικά θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση συντελεστών μεγαλύτερων του 10, ενώ, όταν χρησιμοποιούνται τέτοιοι συντελεστές, η χρήση τους θα πρέπει να αιτιολογείται.

27. Όπως περιγράφεται περαιτέρω στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7), τα σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των δόσεων είναι, μεταξύ άλλων, τα εξής:

— σημεία μη γραμμικότητας ή σημεία κλίσης στην καμπύλη δόσης-απόκρισης που είναι γνωστά ή για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ύπαρξης,

— τοξικοκινητική και ρύθμιση της δοσολογίας, στην περίπτωση που λαμβάνει ή δεν λαμβάνει χώρα μεταβολική επαγωγή, κορεσμός ή μη γραμμικότητα μεταξύ εξωτερικων και εσωτερικών δόσεων,

— πρόδρομες αλλοιώσεις, δείκτες επίδρασης ή δείκτες της λειτουργίας βασικών υποκείμενων βιολογικών διεργασιών,

▼M4

— βασικές (ή πιθανολογούμενες) πτυχές του τρόπου δράσης, όπως δόσεις στις οποίες αρχίζει να εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα, διαταράσσονται τα επίπεδα ορμονών, καταβάλλονται οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί κ.λπ.,

— περιοχές στην καμπύλη δόσης-απόκρισης στις οποίες απαιτείται μια ιδιαιτέρως αξιόπιστη εκτίμηση, π.χ. στο πεδίο τιμών της αναμενόμενης δόσης αναφοράς ή ενός πιθανολογούμενου κατώτατου ορίου,

— εκτίμηση των αναμενόμενων επιπέδων έκθεσης του ανθρώπου, ιδίως κατά την επιλογή μεσαίων και χαμηλών δόσεων.

28. Οι μάρτυρες είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα προοριζόμενη για τον έλεγχο του φορέα, εφόσον χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Με εξαίρεση τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση με τα ζώα της ομάδας αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται φορέας, ο όγκος φορέα που χορηγείται στους μάρτυρες είναι ο μεγαλύτερος που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής. Εάν μια ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή και προκαλεί σημαντικά μειωμένη πρόσληψη τροφής λόγω μειωμένης γευστικότητας του σιτηρεσίου, τότε ίσως είναι χρήσιμη ως καταλληλότερος μάρτυρας μια επιπλέον ομάδα-μάρτυρας στην οποία χορηγείται το ίδιο σιτηρέσιο.

Παρασκευή των δόσεων και χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

29. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα, με την τροφή ή το πόσιμο νερό ή με καθετήρα. Πρόσθετες πληροφορίες για την επιλογή οδών και μεθόδων χορήγησης παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7). Η οδός και η μέθοδος χορήγησης εξαρτώνται από τον σκοπό της μελέτης, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τη βιοδιαθεσιμότητά της και την κύρια οδό και μέθοδο έκθεσης του ανθρώπου. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή οδού και μεθόδου χορήγησης. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, η χορήγηση μέσω της στοματικής οδού με καθετήρα θα πρέπει να επιλέγεται συνήθως μόνο για τους παράγοντες για τους οποίους η συγκεκριμένη οδός και μέθοδος χορήγησης αναμένεται εύλογα να αποτελούν ενδεχόμενο τρόπο έκθεσης του ανθρώπου (π.χ. φαρμακευτικές ουσίες). Διατροφικές ή περιβαλλοντικές χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανιοκτόνων, χορηγούνται συνήθως με την τροφή ή το πόσιμο νερό. Ωστόσο, βάσει ορισμένων σεναρίων, π.χ. έκθεση κατά την εργασία, ενδέχεται να είναι καταλληλότερη η χορήγηση μέσω άλλων οδών.

30. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του φορέα και άλλων προσθέτων, κατά περίπτωση: επιδράσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στον μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, επιδράσεις στις χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, ως πρώτη επιλογή, διαλύματος/γαλακτώματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) κατόπιν, και, ως τελευταία επιλογή, η χρήση διαλύματος σε άλλο φορέα. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, τα τοξικά χαρακτηριστικά του φορέα πρέπει να είναι γνωστά. Πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τη σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την ομοιογένεια των διαλυμάτων ή σιτηρεσίων δόσης (κατά περίπτωση) στις συνθήκες χορήγησης (π.χ. στο σιτηρέσιο).

31. Για τις χημικές ουσίες που χορηγούνται με την τροφή ή το πόσιμο νερό πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες ελεγχόμενης χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το κανονικό διατροφικό ισοζύγιο ή ισοζύγιο νερού. Σε μελέτες μακροπρόθεσμης τοξικότητας με χορήγηση με την τροφή, η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά ένα ανώτατο όριο 5 % του συνολικού σιτηρεσίου, ώστε να αποφεύγονται διατροφικές ανισορροπίες. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, πρέπει να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (mg/kg σιτηρεσίου ή ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του σώματος του ζώου (mg/kg βάρους σώματος), υπολογιζόμενο σε εβδομαδιαία βάση. Η χρησιμοποιούμενη εναλλακτική επιλογή πρέπει να διευκρινίζεται.

▼M4

32. Στην περίπτωση χορήγησης από το στόμα, χορηγούνται στα ζώα δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθημερινά (επτά ημέρες την εβδομάδα) για μια περίοδο 12 μηνών (φάση χρόνιας τοξικότητας) ή 24 μηνών (φάση καρκινογενετικότητας), βλέπε επίσης παραγράφους 33 και 34. Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιοδήποτε άλλο καθεστώς δοσολογίας που τυχόν χρησιμοποιείται, π.χ. χορήγηση πέντε ημέρες την εβδομάδα. Στην περίπτωση χορήγησης μέσω του δέρματος, τα ζώα εκτίθενται κανονικά στην ελεγχόμενη χημική ουσία για τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, όπως προσδιορίζεται στο κεφάλαιο B.9 του παρόντος παραρτήματος (11), για μια περίοδο 12 μηνών (φάση χρόνιας τοξικότητας) ή 24 μηνών (φάση καρκινογενετικότητας). Έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού πραγματοποιείται 6 ώρες την ημέρα, 7 ημέρες την εβδομάδα, αλλά ενδέχεται να εφαρμόζεται επίσης έκθεση για 5 ημέρες την εβδομάδα, εφόσον παρέχεται σχετική αιτιολόγηση. Η περίοδος έκθεσης είναι συνήθως μια περίοδος 12 μηνών (φάση χρόνιας τοξικότητας) ή 24 μηνών (φάση καρκινογενετικότητας). Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Θα πρέπει να παρέχεται αιτιολόγηση στην περίπτωση που εφαρμόζεται διάρκεια έκθεσης μικρότερη των 6 ωρών ημερησίως. Βλέπε επίσης κεφάλαιο B.8 του παρόντος παραρτήματος (9).

33. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με καθετήρα στα ζώα, η χορήγηση πρέπει να γίνεται με τη βοήθεια καθετήρα στομάχου ή κατάλληλης διασωλήνωσης, την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα. Συνήθως χορηγείται μία δόση μία φορά την ημέρα, ενώ, στην περίπτωση που μια χημική ουσία έχει τοπική ερεθιστική δράση, μπορεί να διατηρείται η ημερήσια δοσολογία με τη χορήγηση μισών δόσεων (δύο φορές την ημέρα). Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος θα πρέπει να διατηρείται στο ελάχιστο εφικτό επίπεδο και δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κανονικά το 1 ml/100 g βάρους σώματος, στην περίπτωση των τρωκτικών (31). Οι διαφορές του όγκου πρέπει να ελαχιστοποιούνται ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης. Εξαίρεση αποτελούν οι ενδεχομένως διαβρωτικές ή ερεθιστικές χημικές ουσίες, οι οποίες θα πρέπει να αραιώνονται ώστε να αποφεύγονται οι σοβαρές τοπικές επιδράσεις. Θα πρέπει να αποφεύγεται η διεξαγωγή δοκιμών σε συγκεντρώσεις που πιθανόν να αποδειχθούν διαβρωτικές ή ερεθιστικές για το γαστρεντερικό σύστημα.

Διάρκεια της μελέτης

34. Η περίοδος χορήγησης δόσεων και η διάρκεια της φάσης χρόνιας τοξικότητας της παρούσας μελέτης είναι συνήθως 12 μήνες. Ωστόσο, ο σχεδιασμός της μελέτης επιτρέπει επίσης την εφαρμογή της ως μελέτη είτε μικρότερης διάρκειας (π.χ. για 6 ή 9 μήνες) είτε μεγαλύτερης (π.χ. για 18 ή 24 μήνες), ανάλογα με τις απαιτήσεις συγκεκριμένων κανονιστικών καθεστώτων ή ανάλογα με συγκεκριμένους μηχανιστικούς σκοπούς. Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιαδήποτε απόκλιση από τη διάρκεια έκθεσης των 12 μηνών, ιδίως στην περίπτωση βραχύτερων περιόδων. Όλες οι ομάδες δόσεων που κατανέμονται στη φάση αυτή θα τερματίζονται κατά τον προσδιορισθέντα χρόνο ώστε να αξιολογείται η χρόνια τοξικότητα και η μη νεοπλασματική παθολογία. Στις δορυφορικές ομάδες που περιλαμβάνονται στη μελέτη για την παρακολούθηση της αναστρεψιμότητας τυχόν τοξικολογικών αλλαγών προκαλούμενων από την ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να μην χορηγούνται δόσεις για μια περίοδο τουλάχιστον 4 εβδομάδων, η οποία, ωστόσο, δεν θα υπερβαίνει το ένα τρίτο της συνολικής διάρκειας της μελέτης μετά την παύση της έκθεσης.

35. Η διάρκεια της φάσης καρκινογενετικότητας της μελέτης θα είναι κανονικά 24 μήνες για τα τρωκτικά, ήτοι χρόνος που καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της συνήθους διάρκειας ζωής των χρησιμοποιούμενων ζώων. Ενδέχεται να πραγματοποιούνται μελέτες μικρότερης ή μεγαλύτερης διάρκειας, ανάλογα με τη διάρκεια ζωής της φυλής των χρησιμοποιούμενων ζωικών ειδών, βάσει σχετικής αιτιολόγησης. Στην περίπτωση χρήσης συγκεκριμένων φυλών ποντικών, π.χ. των φυλών AKR/J, C3H/J ή C57BL/6J, ενδέχεται να είναι καταλληλότερο διάστημα μελέτης 18 μηνών. Κατωτέρω παρέχονται ορισμένες κατευθύνσεις σχετικά με τη διάρκεια της μελέτης, τον τερματισμό της και την επιβίωση. Περαιτέρω κατευθύνσεις, συμπεριλαμβανομένων εκτιμήσεων σχετικά με τη δυνατότητα αποδοχής μιας μελέτης αρνητικής καρκινογενετικότητας σε σχέση με τα δεδομένα επιβίωσης στη μελέτη, περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 του ΟΟΣΑ (7).

▼M4

— Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο τερματισμού της μελέτης όταν ο αριθμός των επιζώντων ζώων στις ομάδες με τις χαμηλότερες δόσεις ή στην ομάδα των μαρτύρων φτάσει σε ποσοστά κατώτερα του 25 %.

— Δεν απαιτείται τερματισμός της μελέτης στην περίπτωση που μόνο τα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης πεθάνουν πρόωρα λόγω τοξικότητας.

— Τα δεδομένα επιβίωσης θα πρέπει να εξετάζονται χωριστά για κάθε φύλο.

— Η μελέτη δεν θα πρέπει να επεκτείνεται πέραν του σημείου στο οποίο τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα από τη μελέτη δεν επαρκούν πλέον για την πραγματοποίηση μιας στατιστικά έγκυρης αξιολόγησης.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ (ΦΑΣΗ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ)

36. Θα πρέπει να ελέγχονται όλα τα ζώα, συνήθως στην αρχή και το τέλος κάθε ημέρας, καθώς και τα Σαββατοκύριακα και τις αργίες, ώστε να διαπιστώνεται τυχόν νοσηρότητα ή θνησιμότητά τους. Γενικές κλινικές παρατηρήσεις πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον μια φορά την ημέρα, κατά προτίμηση την (τις) ίδια(-ες) ώρα(-ες) κάθε μέρα και λαμβάνοντας υπόψη τον χρόνο κορυφώσεως των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης, στην περίπτωση χορήγησης με καθετήρα.

37. Όλα τα ζώα πρέπει να υποβληθούν σε λεπτομερή κλινική παρατήρηση τουλάχιστον μία φορά πριν από την πρώτη έκθεση (προκειμένου να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ζώων), στο τέλος της πρώτης εβδομάδας της μελέτης και, στη συνέχεια, σε μηνιαία βάση. Το πρωτόκολλο παρατήρησης θα πρέπει να είναι καθορισμένο έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν αποκλίσεις μεταξύ των επιμέρους προσώπων που διενεργούν την παρατήρηση και να είναι ανεξάρτητες της ομάδας αγωγής. Οι παρατηρήσεις αυτές πρέπει να διενεργούνται έξω από τους κλωβούς, κατά προτίμηση σ' έναν τυποποιημένο χώρο και σε διάφορες χρονικές στιγμές σε κάθε περίπτωση. Καταγράφονται προσεκτικά, κατά προτίμηση με συστήματα βαθμολόγησης καθορισμένα σαφώς από το εργαστήριο. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να είναι ελάχιστες οι διαφορές στις συνθήκες παρατήρησης. Καταγράφονται, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα, στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς, στους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις καθώς και αυτόνομες ενέργειες (όπως δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή της διαμέτρου της κόρης του οφθαλμού, του ρυθμού της αναπνοής). Καταγράφονται επίσης μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση και στην απόκριση κατά τη μεταχείριση καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση του εαυτού τους, συνεχείς περιστροφές) ή περίεργη συμπεριφορά (όπως αυτοακρωτηριασμός, βάδισμα προς τα πίσω) (32).

38. Η οφθαλμολογική εξέταση, με χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται σε όλα τα ζώα πριν από την πρώτη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στο τέλος της μελέτης, η εξέταση πρέπει να διενεργείται, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς που σχετίζονται με την αγωγή, πρέπει να εξετάζονται όλα τα ζώα. Εάν η ανάλυση της δομής ή άλλες πληροφορίες καταδεικνύουν πρόκληση οφθαλμικής τοξικότητας, θα πρέπει να αυξηθεί η συχνότητα της οφθαλμικής εξέτασης.

39. Στην περίπτωση χημικών ουσιών οι οποίες, βάσει προηγούμενων μελετών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση, μπορούν να προκαλέσουν νευροτοξικές επιδράσεις, ενδέχεται να διενεργούνται προαιρετικά πριν από την έναρξη της μελέτης και, μετά την έναρξη, ανά 3 μήνες έως και τη συμπλήρωση 12 μηνών, καθώς και στο τέλος της μελέτης (εάν η μελέτη διαρκεί περισσότερο από 12 μήνες), αξιολόγηση της αισθητηριακής ανταπόκρισης σε διαφορετικών ειδών ερεθίσματα (32) (π.χ. ακουστικά, οπτικά και ιδιοδεκτικά) (33), (34), (35), αξιολόγηση της δύναμης λαβής (36) και αξιολόγηση της μυϊκής δραστηριότητας (37). Λεπτομέρειες σχετικά με τις διαδικασίες που μπορούν να ακολουθηθούν παρέχονται στις σχετικές βιβλιογραφικές παραπομπές. Ωστόσο, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν επίσης εναλλακτικές διαδικασίες από αυτές που αναφέρονται στις παραπομπές.

▼M4

40. Στην περίπτωση χημικών ουσιών οι οποίες, βάσει προηγούμενων μελετών τοξικότητας 28 ημερών και/ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση, μπορούν να προκαλέσουν ανοσοτοξικές επιδράσεις, ενδέχεται να διενεργούνται προαιρετικά περαιτέρω έρευνες για το συγκεκριμένο καταληκτικό σημείο στο τέλος της μελέτης.

Βάρος σώματος, κατανάλωση τροφής και νερού και απόδοση της τροφής

41. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της αγωγής, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση τροφής και η απόδοση της τροφής θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια, στην περίπτωση που η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού. Μετρήσεις της κατανάλωσης ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη στις μελέτες κατά τις οποίες η δραστηριότητα πόσης μπορεί να μεταβληθεί.

Αιματολογικές εξετάσεις και κλινική βιοχημεία

42. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν τρωκτικά, πρέπει να διενεργούνται αιματολογικές εξετάσεις σε όλα τα ζώα της μελέτης (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα), κατά τον 3ο, τον 6ο και το 12ο μήνα, καθώς και στο τέλος της μελέτης (αν διαρκεί περισσότερο από 12 μήνες). Στην περίπτωση χρήσης ποντικών, ενδέχεται να απαιτούνται δορυφορικά ζώα για τη διενέργεια όλων των απαιτούμενων αιματολογικών εξετάσεων (βλέπε παράγραφο 19). Σε μελέτες που διεξάγονται σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, λαμβάνονται δείγματα από μικρότερο αριθμό ζώων (π.χ. 4 ζώα ανά φύλο και ανά ομάδα, στην περίπτωση μελετών σε σκύλους), σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας και στο τέλος της μελέτης, όπως προβλέπεται και για τα τρωκτικά. Ενδέχεται να μη χρειάζεται να διενεργηθούν μετρήσεις τον 3ο μήνα, είτε σε τρωκτικά είτε σε άλλα είδη, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις αιματολογικές παραμέτρους σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο, π.χ. με καρδιακή παρακέντηση ή από τον οφθαλμικό κόγχο, οπισθοβολβικά, υπό αναισθησία.

43. Πρέπει να εξετάζονται οι ακόλουθες παράμετροι (38): συνολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων και διαφορικός λευκοκυτταρικός τύπος, αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, αριθμός αιμοπεταλίων, αιματοκρίτης (HCT), μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων (MCV), μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (MCH), μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης (MCHC), χρόνος προθρομβίνης και ενεργός μερικός χρόνος θρομβοπλαστίνης. Άλλες αιματολογικές παράμετροι, όπως τα σωμάτια Heinz ή άλλη άτυπη μορφολογία ερυθρών αιμοσφαιρίων ή μεθαιμοσφαιρίνης ενδέχεται να μετρώνται κατά περίπτωση, ανάλογα με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Θα πρέπει να επιλεγεί συνολικά μια ευέλικτη προσέγγιση, ανάλογα με τις παρατηρούμενες και/ή αναμενόμενες επιδράσεις μιας δεδομένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία επηρεάζει το αιμοποιητικό σύστημα, ενδέχεται να ενδείκνυται εξέταση του αριθμού των δικτυοερυθροκυττάρων και της κυτταρολογίας του μυελού των οστών, αν και οι εξετάσεις αυτές δεν χρειάζεται να διενεργούνται συχνά.

44. Διενεργούνται βιοχημικές εξετάσεις για τη διερεύνηση κύριων τοξικών επιδράσεων στους ιστούς και, ειδικότερα, στους νεφρούς και στο ήπαρ, σε δείγματα αίματος που λαμβάνονται από όλα τα ζώα της μελέτης (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα), κατά τα ίδια χρονικά διαστήματα που προβλέπονται για τις αιματολογικές εξετάσεις. Στην περίπτωση χρήσης ποντικών, ενδέχεται να απαιτούνται δορυφορικά ζώα για τη διενέργεια όλων των απαιτούμενων εξετάσεων κλινικής βιοχημείας. Σε μελέτες που διεξάγονται σε άλλα είδη εκτός των τρωκτικών, λαμβάνονται δείγματα από μικρότερο αριθμό ζώων (π.χ. 4 ζώα ανά φύλο και ανά ομάδα, στην περίπτωση μελετών σε σκύλους), σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας και στο τέλος της μελέτης, όπως προβλέπεται και για τα τρωκτικά. Ενδέχεται να μη χρειάζονται μετρήσεις τον 3ο μήνα, είτε σε τρωκτικά είτε

▼M4

σε άλλα είδη, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις βιοχημικές παραμέτρους σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Συνιστάται να παραμένουν νηστικά τα ζώα (με την εξαίρεση των ποντικών) τη νύχτα που προηγείται της αιμοληψίας ([1]). Θα πρέπει να εξετάζονται οι ακόλουθες παράμετροι (38): γλυκόζη, ουρία (άζωτο ουρίας), κρεατινίνη, ολικές πρωτεΐνες, αλβουμίνη, ασβέστιο, νάτριο, κάλιο, ολική χοληστερόλη, τουλάχιστον δύο κατάλληλες εξετάσεις για την αξιολόγηση της ηπατοκυτταρικής επίδρασης (αλανινο-αμινοτρανσφεράση, ασπαραγινική αμινοτρασφεράση, γλουταμική αφυδρογονάση, ολικά χολικά οξέα) (39) και τουλάχιστον δύο κατάλληλες εξετάσεις για την αξιολόγηση της επίδρασης στο ηπατοχολικό σύστημα (αλκαλική φωσφατάση, γ-γλουταμυλοτρανσφεράση, 5-νουκλεοτιδάση, ολική χολερυθρίνη, ολικά χολικά οξέα) (39). Μπορούν να μετρώνται, κατά περίπτωση, και άλλες παράμετροι κλινικής χημείας, όπως τα τριγλυκερίδια μετά από νηστεία, ειδικές ορμόνες και η χολινεστεράση, ανάλογα με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Γενικά πρέπει να ακολουθείται ευέλικτη προσέγγιση, ανάλογα με τις παρατηρούμενες και/ή αναμενόμενες επιδράσεις από μια συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία.

45. Θα πρέπει να διενεργούνται αναλύσεις ούρων σε όλα τα ζώα της μελέτης (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά ομάδα), σε δείγματα που συλλέγονται κατά τα ίδια διαστήματα με αυτά που προβλέπονται για τις αιματολογικές εξετάσεις και τις εξετάσεις κλινικής χημείας. Ενδέχεται να μη χρειάζονται μετρήσεις τον 3ο μήνα, εάν δεν έχει διαπιστωθεί επίδραση στις αναλύσεις ούρων σε προηγούμενη μελέτη 90 ημερών που έχει διεξαχθεί με τη χρήση συγκρίσιμων επιπέδων δόσης. Οι ακόλουθες παράμετροι περιλαμβάνονται σε μια σύσταση εμπειρογνωμόνων για τις μελέτες κλινικής παθολογίας (38): εμφάνιση, όγκος, οσμωτική ικανότητα ή ειδικό βάρος, pH, ολικές πρωτεΐνες και γλυκόζη. Άλλες εξετάσεις περιλαμβάνουν την κετόνη, το ουροχολιγόνο, τη χολερυθρίνη και τη μικροσκοπική αιμορραγία. Πρόσθετες παράμετροι μπορεί να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχει ανάγκη επέκτασης της έρευνας των παρατηρηθεισών επιδράσεων.

46. Γενικά θεωρείται ότι απαιτείται προσδιορισμός αιματολογικών και κλινικών βιοχημικών μεταβλητών αναφοράς πριν από μελέτες αγωγής σε σκύλους, αλλά όχι πριν από μελέτες σε τρωκτικά (38). Ωστόσο, εάν τα ιστορικά δεδομένα αναφοράς (βλέπε παράγραφο 58) είναι ανεπαρκή, εξετάζεται κατά πόσον θα πρέπει να προσδιοριστούν τα δεδομένα αυτά.

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Νεκροψία

47. Όλα τα ζώα της μελέτης πρέπει κανονικά να υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ωστόσο, ενδέχεται να προβλέπεται (στις ομάδες ενδιάμεσης θανάτωσης ή στις δορυφορικές ομάδες) περιορισμός των μετρήσεων αυτών σε συγκεκριμένες βασικές μετρήσεις σχετικά, παραδείγματος χάριν, με τη νευροτοξικότητα ή την ανοσοτοξικότητα (βλέπε παράγραφο 21). Δεν απαιτείται νεκροψία και διεξαγωγή των επακόλουθων διαδικασιών που περιγράφονται στις επόμενες παραγράφους στα ζώα αυτά. Ενδέχεται να απαιτείται η διενέργεια νεκροψίας σε ζώα-φρουρούς κατά περίπτωση, επαφιέμενη στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης.

([1]) Για ορισμένες μετρήσεις στον ορό και στο πλάσμα του αίματος και ιδίως της γλυκόζης, προτιμάται τα ζώα να έχουν υποβληθεί σε ολονύκτια νηστεία. Ο κυριότερος λόγος για την προτίμηση αυτή είναι ότι οι διακυμάνσεις που είναι αναπόφευκτες σε περίπτωση μη υποβολής τους σε νηστεία, τείνουν να συγκαλύψουν ορισμένες ανεπαίσθητες επιδράσεις δυσκολεύοντας την ερμηνεία. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η νηστεία αυτή μπορεί να επηρεάσει τον γενικό μεταβολισμό των ζώων και, ιδίως στις μελέτες διατροφής, να διαταράξει την καθημερινή έκθεση στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Όλα τα ζώα θα πρέπει να αξιολογούνται στην ίδια φυσιολογική κατάσταση και, κατά προτίμηση, η διενέργεια αναλυτικών ή νευρολογικών εκτιμήσεων θα πρέπει να προγραμματίζεται κάποια ημέρα διαφορετική από την ημέρα δειγματοληψίας για την κλινική βιοχημεία.

▼**M4**

48. Θα πρέπει να μετράται το βάρος των οργάνων όλων των ζωών, εκτός αυτών που εξαιρούνται βάσει του τελευταίου μέρους της παραγράφου 47. Τα επινεφρίδια, ο εγκέφαλος, οι επιδιδυμίδες, η καρδιά, οι νεφροί, το ήπαρ, οι ωοθήκες, η σπλήνα, οι όρχεις, ο θυρεοειδής (ζυγίζεται μετά τη μονιμοποίηση μαζί με τους παραθυρεοειδείς) και η μήτρα όλων των ζώων (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα και/ή όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει) καθαρίζονται από τυχόν άλλους προσκολλημένους ιστούς, όπως ενδείκνυται, και ζυγίζονται υγράκαι/ή αμέσως μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση.

49. Οι ακόλουθοι ιστοί πρέπει να διατηρούνται στο καταλληλότερο μονιμοποιητικό υλικό, τόσο για τον τύπο του ιστού όσο και για το είδος της ιστοπαθολογικής εξέτασης που πρόκειται να ακολουθήσει (40) (οι ιστοί που αναφέρονται εντός αγκυλών διατηρούνται προαιρετικά):

όλες οι μακροσκοπικές βλάβες	καρδιά	πάγκρεας	στόμαχος (προστόμαχος, αδενικό τμήμα στομάχου)
επινεφρίδιος αδένας	ειλεός	παραθυρεοειδής αδένας	[δόντια]
αορτή	νήστις	περιφερειακό νεύρο	όρχις
εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	νεφρός	υπόφυση	θύμος
τυφλό έντερο	δακρυγόνος αδένας (εξωβολβικός)	προστάτης	θυρεοειδής
τράχηλος της μήτρας	ήπαρ	ορθό	[γλώσσα]
πηκτικός αδένας	πνεύμονας	σιελογόνος αδένας	τραχεία
κόλον	λεμφαδένες (επιπολής και εν τω βάθει)	σπερματοδόχος κύστη	ουροδόχος κύστη
δωδεκαδάκτυλο	μαστικός αδένας (υποχρεωτικά για θηλυκά ζώα και, εάν μπορεί ορατά να ανατμηθεί, από αρσενικά ζώα)	σκελετικός μυς	μήτρα (συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου)
επιδιδυμίδα	[ανώτερη αναπνευστική οδός, συμπεριλαμβανομένης της μύτης, των κογχών και των παραρρινίων κόλπων]	δέρμα	[ουρητήρας]
οφθαλμός (συμπεριλαμβανομένου του αμφιβληστροειδή)	οισοφάγος	νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)	[ουρήθρα]
[μηριαίο οστό μαζί με την άρθρωση]	[οσφρητικός βολβός]	σπλήνα	κόλπος
χοληδόχος κύστη (για άλλα είδη εκτός του επίμυ)	ωοθήκη	[στέρνο],	τομή του μυελού των οστών και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών
αδένας Harderian			

▼M4

Στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να διατηρούνται αμφότερα τα όργανα. Βάσει των κλινικών και άλλων ευρημάτων, ενδέχεται να πρέπει να εξεταστούν επιπρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν χορήγηση μέσω του δέρματος, θα πρέπει να εξετάζονται τα όργανα που αναφέρονται στον κατάλογο οργάνων που πρέπει να εξετάζονται σε μελέτες χορήγησης από το στόμα, ενώ απαιτείται επίσης ειδική δειγματοληψία και διατήρηση δέρματος από το σημείο έκθεσης. Σε αναπνευστικές μελέτες, ο κατάλογος των προς διατήρηση και εξέταση ιστών της αναπνευστικής οδού θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις συστάσεις του κεφαλαίου Β.8 (9) και του κεφαλαίου Β.29 (10) του παρόντος παραρτήματος. Στην περίπτωση άλλων οργάνων/ιστών (επιπροσθέτως των συγκεκριμένων ιστών της αναπνευστικής οδού που πρέπει να διατηρούνται), θα πρέπει να εξετάζεται ο κατάλογος οργάνων που αναφέρεται στην περίπτωση μελετών έκθεσης μέσω του στόματος.

Ιστοπαθολογία

50. Διατίθεται καθοδήγηση σχετικά με τις βέλτιστες πρακτικές κατά τη διεξαγωγή μελετών τοξικολογικής παθολογίας (40). Ιστοπαθολογικές εξετάσεις πρέπει να διενεργούνται τουλάχιστον:

— σε όλους τους ιστούς της ομάδας υψηλής δόσης και της ομάδας των μαρτύρων,

— σε όλους τους ιστούς των ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης,

— σε όλους τους ιστούς που εμφανίζουν μακροσκοπικές ανωμαλίες,

— σε ιστούς-στόχο ή ιστούς που εμφάνισαν σχετικές με την αγωγή αλλοιώσεις στην ομάδα υψηλής δόσης, από όλα τα ζώα σε όλες τις άλλες ομάδες δόσεων,

— στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να εξετάζονται αμφότερα τα όργανα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ (ΦΑΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ)

51. Θα πρέπει να ελέγχονται όλα τα ζώα, συνήθως στην αρχή και το τέλος κάθε ημέρας, καθώς και τα σαββατοκύριακα και τις αργίες, ώστε να διαπιστώνεται τυχόν νοσηρότητα ή θνησιμότητά τους. Τα ζώα θα πρέπει να ελέγχονται επίσης μία φορά την ημέρα ώστε να διαπιστώνονται συγκεκριμένες ενδείξεις τοξικολογικής σημασίας. Στην περίπτωση μελετών με καθετήρα, τα ζώα θα πρέπει να ελέγχονται αμέσως μετά τη χορήγηση των δόσεων. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην ανάπτυξη όγκων. Επίσης, θα πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος εμφάνισης, η τοποθεσία, οι διαστάσεις, η μορφή και η πρόοδος κάθε μακροσκοπικά ορατού ή ψηλαφητού όγκου.

52. Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται κατά την έναρξη της αγωγής, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση τροφής και η απόδοση της τροφής θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια. Η κατανάλωση νερού θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τις πρώτες 13 εβδομάδες και τουλάχιστον μία φορά τον μήνα στη συνέχεια, στην περίπτωση που η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού. Μετρήσεις της κατανάλωσης ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη στις μελέτες κατά τις οποίες η δραστηριότητα πόσης μπορεί να μεταβληθεί.

▼**M4**

Αιματολογικές, βιοχημικές και άλλες εξετάσεις

53. Για να μεγιστοποιούνται οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τη μελέτη, ιδίως σε σχέση με ζητήματα τρόπου δράσης, μπορούν να λαμβάνονται δείγματα αίματος για αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις, αν και αυτό επαφίεται στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Ενδέχεται να ενδείκνυται επίσης ανάλυση ούρων. Δεδομένα για τα ζώα που χρησιμοποιούνται στη φάση χρόνιας τοξικότητας της μελέτης, συνήθως διάρκειας 12 μηνών (παράγραφος 34), παρέχουν πληροφορίες για τις παραμέτρους αυτές. Περαιτέρω κατευθύνσεις για την αξία λήψης των δειγμάτων αυτών στο πλαίσιο μιας μελέτης καρκινογενετικότητας περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 116 (7). Εάν λαμβάνονται δείγματα αίματος, αυτά πρέπει να λαμβάνονται στο τέλος της περιόδου δοκιμής, αμέσως πριν από τη διαδικασία θανάτωσης των ζώων ή στο πλαίσιο αυτής. Πρέπει να λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο, π.χ. με καρδιακή παρακέντηση ή από τον οφθαλμικό κόγχο, οπισθοβολβικά, υπό αναισθησία. Μπορούν επίσης να παρασκευάζονται επιχρίσματα αίματος για εξέταση, ιδίως εάν ο μυελός των οστών αποτελεί ενδεχομένως όργανο-στόχο, αν και η αξία της εξέτασης επιχρισμάτων αίματος στη φάση καρκινογενετικότητας για την αξιολόγηση του δυναμικού καρκινογενετικότητας/ογκογενετικότητας έχει αμφισβητηθεί (38).

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Νεκροψία

54. Όλα τα ζώα της μελέτης, εκτός των ζώων-φρουρών και άλλων δορυφορικών ζώων (βλέπε παράγραφο 20), πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ενδέχεται να απαιτείται η διενέργεια νεκροψίας σε ζώα-φρουρούς και άλλα δορυφορικά ζώα κατά περίπτωση, επαφιέμενη στη διακριτική ευχέρεια του διευθυντή της μελέτης. Το βάρος των οργάνων δεν μετράται συνήθως στο πλαίσιο μελετών καρκινογενετικότητας, καθώς οι αλλαγές λόγω γήρανσης και, σε μεταγενέστερα στάδια, η ανάπτυξη όγκων ανατρέπουν τη χρησιμότητα των δεδομένων βάρους των οργάνων. Ωστόσο, το βάρος των οργάνων ενδέχεται να είναι εξαιρετικά σημαντικό για την αξιολόγηση του βάρους της απόδειξης και ιδίως για εκτιμήσεις του τρόπου δράσης. Οι σχετικές μετρήσεις στο πλαίσιο μιας δορυφορικής μελέτης θα πρέπει να εκτελούνται εντός ενός έτους, το αργότερο, από την έναρξη της μελέτης.

55. Οι ακόλουθοι ιστοί διατηρούνται στο καταλληλότερο μονιμοποιητικό υλικό, τόσο για τον τύπο ιστού όσο και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης που πρόκειται να ακολουθήσει (40) (οι ιστοί που αναφέρονται εντός αγκυλών διατηρούνται προαιρετικά):

όλες οι μακροσκοπικές βλάβες	καρδιά	πάγκρεας	στόμαχος (προστόμαχος, αδενικό τμήμα στομάχου)
επινεφρίδιος αδένας	ειλεός	παραθυρεοειδής αδένας	[δόντια]
αορτή	νήστις	περιφερειακό νεύρο	όρχις
εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	νεφρός	υπόφυση	θύμος
τυφλό έντερο	δακρυγόνος αδένας (εξωβολβικός)	προστάτης	θυρεοειδής
τράχηλος της μήτρας	ήπαρ	ορθό	[γλώσσα]
πηκτικός αδένας	πνεύμονας	σιελογόνος αδένας	τραχεία
κόλον	λεμφαδένες (επιπολής και εν τω βάθει)	σπερματοδόχος κύστη	ουροδόχος κύστη

▼M4

δωδεκαδάκτυλο	μαστικός αδένας (υποχρεωτικά για θηλυκά ζώα και, εάν μπορεί ορατά να ανατμηθεί, από αρσενικά ζώα)	σκελετικός μυς	μήτρα (συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου της μήτρας)
επιδιδυμίδα	[ανώτερη αναπνευστική οδός, συμπεριλαμβανομένης της μύτης, των κογχών και των παραρρινίων κόλπων]	δέρμα	[ουρητήρας]
οφθαλμός (συμπεριλαμβανομένου του αμφιβληστροειδή)	οισοφάγος	νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός)	[ουρήθρα]
[μηριαίο οστό μαζί με την άρθρωση]	[οσφρητικός βολβός]	σπλήνα	κόλπος
χοληδόχος κύστη (για άλλα είδη εκτός του επίμυ)	ωοθήκη	[στέρνο],	τομή του μυελού των οστών και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών
αδένας Harderian			

Στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να διατηρούνται αμφότερα τα όργανα. Βάσει των κλινικών και άλλων ευρημάτων, ενδέχεται να πρέπει να εξεταστούν επιπρόσθετοι ιστοί. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν χορήγηση μέσω του δέρματος, θα πρέπει να εξετάζονται τα όργανα που αναφέρονται στον κατάλογο οργάνων που πρέπει να εξετάζονται σε μελέτες χορήγησης από το στόμα, ενώ απαιτείται επίσης ειδική δειγματοληψία και διατήρηση δέρματος από το σημείο έκθεσης. Σε αναπνευστικές μελέτες, ο κατάλογος των προς διατήρηση και εξέταση ιστών της αναπνευστικής οδού θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις συστάσεις του κεφαλαίου B.8 (8) και του κεφαλαίου B.29 (9) του παρόντος παραρτήματος. Στην περίπτωση άλλων οργάνων/ιστών (επιπροσθέτως των συγκεκριμένων ιστών της αναπνευστικής οδού που πρέπει να διατηρούνται), θα πρέπει να εξετάζεται ο κατάλογος οργάνων που παρατίθεται για την περίπτωση των μελετών έκθεσης μέσω του στόματος.

Ιστοπαθολογία

56. Διατίθεται καθοδήγηση σχετικά με τις βέλτιστες πρακτικές κατά τη διεξαγωγή μελετών τοξικολογικής παθολογίας (40). Εξέταση θα πρέπει να διενεργείται τουλάχιστον στους ακόλουθους ιστούς:

— σε όλους τους ιστούς της ομάδας υψηλής δόσης και της ομάδας των μαρτύρων,

— σε όλους τους ιστούς των ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης,

— σε όλους τους ιστούς που εμφανίζουν μακροσκοπικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένων όγκων,

— όταν παρατηρούνται σχετικές με την αγωγή ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στην ομάδα υψηλής δόσης, πρέπει να εξετάζονται οι ίδιοι ιστοί σε όλα τα ζώα σε όλες τις άλλες ομάδες δόσεων,

— στην περίπτωση οργάνων σε ζεύγη, π.χ. νεφροί, επινεφρίδια, θα πρέπει να εξετάζονται αμφότερα τα όργανα.

▼**M4**

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ (ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ)

Στοιχεία

57. Θα πρέπει να παρέχονται στοιχεία για όλες τις παραμέτρους που αξιολογήθηκαν για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, όλα τα στοιχεία πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα αγωγής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της αγωγής, τον αριθμό των ζώων που ευρέθησαν νεκρά κατά τη διάρκεια της αγωγής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν εκδηλώσεις τοξικότητας, περιγραφή των παρατηρηθέντων τοξικών συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισής τους, της διάρκειας και της σοβαρότητάς τους, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν αλλοιώσεις, το είδος των αλλοιώσεων και το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν καθέναν από τους τύπους αλλοιώσεων. Συνοπτικοί πίνακες στοιχείων θα πρέπει να αναφέρουν τις μέσες και τυπικές αποκλίσεις (όσον αφορά δεδομένα συνεχούς δοκιμής) που διαπιστώθηκαν σε ζώα που εμφάνισαν τοξικές επιδράσεις ή κακώσεις, καθώς και διαβάθμιση των κακώσεων.

58. Ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες ενδέχεται να αποδειχθούν πολύτιμα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης, π.χ. στην περίπτωση που υπάρχουν ενδείξεις ότι τα δεδομένα που προκύπτουν από παράλληλους μάρτυρες αποκλίνουν σημαντικά σε σύγκριση με πρόσφατα δεδομένα από ζώα-μάρτυρες από την ίδια εγκατάσταση ελέγχου/αποικία. Εφόσον έχουν αξιολογηθεί, θα πρέπει να υποβάλλονται ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες από το ίδιο εργαστήριο και να αφορούν ζώα της ίδιας ηλικίας και φυλής, τα οποία έχουν παραχθεί κατά τη διάρκεια των πέντε ετών που προηγήθηκαν της συγκεκριμένης μελέτης.

59. Όταν είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με τη βοήθεια στατιστικής μεθόδου γενικής αποδοχής. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα πρέπει να επιλέγονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης (παράγραφος 9). Η επιλογή θα πρέπει να προβλέπει διορθώσεις βάσει της επιβίωσης, εφόσον απαιτούνται.

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

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα ταυτοποίησης,

— πηγή χημικής ουσίας,

— αριθμό παρτίδας,

— πιστοποιητικό χημικής ανάλυσης.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Για τα πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της επιλογής,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων στην αρχή της δοκιμής,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφή κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

▼M4

Συνθήκες δοκιμής:

— αιτιολόγηση της οδού χορήγησης και της επιλογής δόσης,

— εφόσον έχουν χρησιμοποιηθεί, στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων,

— λεπτομερή στοιχεία για το σκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/παρασκεύασμα του σιτηρεσίου,

— αναλυτικά στοιχεία για τη συγκέντρωση, τη σταθερότητα και την ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— οδός χορήγησης και λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— στην περίπτωση αναπνευστικών μελετών, εάν αφορούσαν ρινική ή ολόσωμη έκθεση,

— πραγματικές δόσεις (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή ή το πόσιμο νερό (mg/kg ή ppm) σε πραγματική δόση, εφόσον είναι εφικτό,

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Αποτελέσματα (θα πρέπει να παρουσιάζονται συνοπτικά δεδομένα σε πίνακα και δεδομένα για το κάθε ζώο):

Γενικά

— δεδομένα επιβίωσης,

— βάρος του σώματος/μεταβολές βάρους σώματος,

— κατανάλωση τροφής, υπολογισμοί απόδοσης τροφής, εάν έχουν γίνει, και κατανάλωση νερού, κατά περίπτωση,

— τοξικοκινητικά δεδομένα, εάν είναι διαθέσιμα,

— οφθαλμοσκοπικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα),

— αιματολογικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα),

— κλινικά χημικά δεδομένα (εάν είναι διαθέσιμα).

Κλινικά ευρήματα

— ενδείξεις τοξικότητας,

— συχνότητα (και εάν έχει αξιολογηθεί, σοβαρότητα) τυχόν ανωμαλίας,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (εάν είναι παροδικές ή μόνιμες).

Δεδομένα νεκροψίας

— τελικό βάρος σώματος,

— βάρος οργάνων (και λόγος βάρους οργάνων/σώματος, κατά περίπτωση),

— ευρήματα νεκροψίας, συχνότητα και σοβαρότητα ανωμαλιών.

Ιστοπαθολογία

— μη νεοπλασματικά ιστοπαθολογικά ευρήματα,

— νεοπλασματικά ιστοπαθολογικά ευρήματα,

▼M4

— συσχετισμός μεταξύ των μακροσκοπικών και των μικροσκοπικών ευρημάτων,

— αναλυτική περιγραφή όλων των σχετικών με την αγωγή ιστοπαθολογικών ευρημάτων, συμπεριλαμβανομένων διαβαθμίσεων σοβαρότητας,

— αναφορά τυχόν αξιολόγησης αντικειμενοφόρων από ομοτίμους.

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

— συζήτηση τυχόν προσεγγίσεων μοντελοποίησης,

— σχέσεις δόσης-απόκρισης,

— ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες,

— συνεκτίμηση τυχόν πληροφοριών για τον τρόπο δράσης της ουσίας,

— προσδιορισμός τιμών δόσης αναφοράς, NOAEL ή LOAEL,

— σημασία για τον άνθρωπο.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005), Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, *ATLA* 32: 163-208.

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. et al (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, *Food. Chem. Toxicol.* 40: 145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 437-445.

(6) Κεφάλαιο B.27 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή υποχρόνιας τοξικότητας από το στόμα — Μελέτη τοξικότητας 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα σε μη τρωκτικά.

(7) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, διαθέσιμο στον δημόσιο ιστότοπο του ΟΟΣΑ για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών, στη διεύθυνση www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Κεφάλαιο B.8 του παρόντος παραρτήματος: Υποξεία αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 28 ημερών.

(10) Κεφάλαιο B.29 του παρόντος παραρτήματος: Υποχρόνια αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 90 ημερών.

(11) Κεφάλαιο B.9 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα επαναλαμβανόμενης (28 ημέρες) δόσης (δερματική).

▼**M4**

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006), IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans, *Crit. Rev. in Toxicol.* 36: 793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003), The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview, *Crit. Rev. Toxicol.* 33: 581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006), Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk, *Toxicol. Sci.* 89: 51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003), A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action, *Crit. Rev. Toxicol.* 33: 591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. et al. (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. et al. (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. et al. (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. et al. (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 69-98.

(20) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection, *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729-837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays, Foran JA (Ed.), ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. και Lumley C.E. (1994), The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals, *The Toxicologist* 14(1): 214.

(25) Usui T., Griffiths S.A. και Lumley C.E. (1996), The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals, In D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation, Queen's University Press, Belfast, pp. 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997), The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry, *Environ Health Perspect* 105: 1196-1203.

▼**M4**

(27) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33).

(28) National Research Council (1985), Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23, Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, *Journal of Applied Toxicology* 21: 15-23.

(32) IPCS (1986), Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980), Utility of the Neurologic Examination in Rats, *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.

(34) Gad S.C. (1982), A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology, *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.

(35) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991), Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.

(36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979), A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991), Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments, *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.

(38) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996), Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. et al. (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology, *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών..

▼B

B.34 **ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμία.

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται σε κλιμακωτά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες αρσενικών και θηλυκών ζώων. Τα αρσενικά πρέπει να λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και για ένα τουλάχιστον πλήρη σπερματογενετικό κύκλο περίπου (56 ημέρες για τον ποντικό και 70 ημέρες για τον αρουραίο), έτσι ώστε να προκληθούν τυχόν επιπλοκές στη σπερματογένεση από τη δοκιμαζόμενη ουσία.

Τα θηλυκά της γενεάς Γ (Γ = γονείς) πρέπει να λαμβάνουν δόσεις επί δύο τουλάχιστον πλήρεις κύκλους οργασμού ώστε να προκληθούν επιπλοκές στον οργασμό από τη δοκιμαζόμενη ουσία. Κατόπιν, τα ζώα ζευγαρώνονται. Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια της περιόδου του ζευγαρώματος και μετέπειτα μόνο στα θηλυκά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και κατά τη διάρκεια της περιόδου της γαλουχίας.

Για τη λήψη της ουσίας με την εισπνοή, η μέθοδος αυτή θα απαιτήσει τροποποιήσεις.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Κανένα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προπαρασκευή

Πριν από δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα πλήρους ανάπτυξης ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από το πείραμα.

Συνιστάται η δοκιμαζόμενη ουσία να χορηγείται μέσα στη δίαιτα ή στο πόσιμο νερό. Άλλες οδοί λήψης είναι επίσης αποδεκτές. Όλα τα ζώα πρέπει να λαμβάνουν τις δόσεις τους με την ίδια μέθοδο κατά τη διάρκεια της σχετικής περιόδου του πειράματος. Εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο ή άλλα πρόσθετα για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων. πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Η χορήγηση δόσεων θα γίνεται επί επτά ημέρες την εβδομάδα.

▼B

Πειραματόζωα

Επιλογή του είδους

Ο αρουραίος ή ο ποντικός είναι το προτιμώμενο είδος. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται είδη ζώων με χαμηλή γονιμότητα παρά μόνο υγιή ζώα που δεν έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε πειραματικές διαδικασίες. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, στέλεχος, φύλο, βάρος ή/και ηλικία.

Για μια επαρκή εκτίμηση της γονιμότητας, πρέπει να μελετηθούν τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά. Όλα τα ζώα που υποβάλλονται σε αγωγή, καθώς επίσης και τα ζώα μάρτυρες, πρέπει να απογαλακτισθούν πριν από την έναρξη χορήγησης των δόσεων.

Αριθμός και φύλο

Κάθε ομάδα ζώων που υποβάλλονται σε αγωγή, καθώς επίσης και των ζώων μαρτύρων πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό ζώων που να αποδίδει 20 περίπου έγκυα θηλυκά σε περίοδο τοκετού η που να μην απέχουν πολύ από την περίοδο αυτή. Αυτό έχει σαν σκοπό να δημιουργηθούν αρκετές εγκυμοσύνες και απόγονοι για την εξασφάλιση μιας ουσιαστικής αξιολόγησης της ικανότητας της ουσίας να επιδρά στη γονιμότητα, στην εγκυμοσύνη και στη μητρική συμπεριφορά στα ζώα της γενεάς Γ, καθώς επίσης και στον θηλασμό, στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη των απογόνων (Α 1) (Α 1 = απόγονοι πρώτης γενεάς) από τη σύλληψη ως τον απογαλακτισμό.

Συνθήκες δοκιμασίας

Η τροφή και το νερό πρέπει να παρέχονται κατά βούληση. Όταν πλησιάζει η περίοδος του τοκετού, τα έγκυα θηλυκά πρέπει να τοποθετούνται χωριστά σε ειδικά κλουβιά τοκετού, και μπορούν να τους παρέχονται υλικά κατασκευής φωλιάς.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον ομάδες αγωγής και μία ομάδα μάρτυρας. Εάν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, η ομάδα μάρτυρας πρέπει να λαμβάνει το έκδοχο στην ποσότητα που χρησιμοποιείται στο υψηλότερο επίπεδο δόσης. Εάν μια δοκιμαζόμενη ουσία προκαλεί μειωμένη διαιτητική λήψη ή χρήση, τότε πιθανό να θεωρηθεί αναγκαία η χρησιμοποίηση μιας ομάδας μάρτυρα διατροφής κατά ζεύγη. Το καλύτερο είναι, εάν το υψηλότερο επίπεδο δόσης δεν περιοριστεί από τη φυσικοχημική φύση ή τις βιολογικές επιδράσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας, να προκαλεί τοξικότητα αλλά όχι θνησιμότητα στους γονείς (Γ). Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να προκαλούν ελάχιστες τοξικές επιδράσεις, που να μπορούν να αποδοθούν στην δοκιμαζόμενη ουσία, και η χαμηλή δόση δεν θα πρέπει να προκαλεί οποιεσδήποτε παρατηρήσιμες επιπλοκές στους γονείς ή στους απογόνους. Όταν χορηγείται με καθετήρα στομάχου ή κάψουλα, η δόση κάθε ζώου πρέπει να βασίζεται στο ιδιαίτερο βάρος του σώματος κάθε ζώου και να προσαρμόζεται κάθε εβδομάδα ανάλογα με τις μεταβολές του βάρους του σώματος. Για τα θηλυκά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι δόσεις μπορούν να βασίζονται στο βάρος του σώματος κατά την ημέρα 0 ή 6 της εγκυμοσύνης, εφόσον αυτό είναι επιθυμητό.

Οριακή δοκιμασία

Στην περίπτωση ουσίας χαμηλής τοξικότητας, εάν ένα επίπεδο δόσης 1 000 mg/kg τουλάχιστον δεν παράγει οποιαδήποτε ένδειξη επιπλοκής στην αναπαραγωγική λειτουργία, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να θεωρηθούν ότι δεν είναι αναγκαίες. Εάν μία προκαταρκτική μελέτη σε υψηλό επίπεδο δόσης, με σαφείς ενδείξεις μητρικής τοξικότητας, δεν παρουσιάζει επιπλοκές στη γονιμότητα, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να θεωρηθούν ότι δεν είναι αναγκαίες.

▼B

Εκτέλεση της δοκιμασίας

Πειραματικά προγράμματα

Η καθημερινή χορήγηση δόσης στους αρσενικούς γονείς (Γ) πρέπει να αρχίσει όταν έχουν ηλικία πέντε έως εννέα εβδομάδων περίπου, αφού ήδη έχουν απογαλακτισθεί και εγκλιματισθεί επί πέντε τουλάχιστον ημέρες. Στους αρουραίους, η χορήγηση δόσεων συνεχίζεται επί δέκα εβδομάδες πριν από την περίοδο του ζευγαρώματος (για τους ποντικούς οκτώ εβδομάδες). Τα αρσενικά θα πρέπει να θανατωθούν και να εξετασθούν είτε στο τέλος της περιόδου του ζευγαρώματος ή, εναλλακτικά, μπορούν να διατηρηθούν με πειραματική δίαιτα για την ενδεχόμενη παραγωγή δεύτερης ομάδας νεογνών και να θανατωθούν και να εξετασθούν σε κάποιο χρονικό σημείο πριν από το τέλος της μελέτης. Για τους θηλυκούς γονείς (Γ), η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει πέντε ημέρες τουλάχιστον μετά τον εγκλιματισμό, και να συνεχίζεται επί δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από το ζευγάρωμα. Η καθημερινή χορήγηση δόσεων στα θηλυκά (Γ) πρέπει να συνεχίζεται καθόλη την περίοδο ζευγαρώματος των τριών εβδομάδων, κατά την περίοδο εγκυμοσύνης και μέχρι τον απογαλακτισμό των απογόνων (Α1). Πρέπει να ληφθούν υπόψη οι τροποποιήσεις του προγράμματος χορήγησης δόσεων με βάση άλλες διαθέσιμες πληροφορίες για τη δοκιμαζόμενη ουσία, όπως είναι η επαγωγή μεταβολισμού ή βιοσυσσώρευσης.

Διαδικασία ζευγαρώματος

Στις μελέτες τοξικότητας αναπαραγωγής μπορούν να εφαρμοσθούν είτε ζευγαρώματα τύπου V, (ένα αρσενικό προς ένα θηλυκό) ή $^{1}/_{2}$ (ένα αρσενικό προς δύο θηλυκά).

Με βάση τον τύπο ζευγαρώματος$^{1}/_{1}$, ένα θηλυκό πρέπει να τοποθετηθεί με το ίδιο αρσενικό μέχρι ότου επέλθει η εγκυμοσύνη ή μέχρις ότου περάσουν τρεις εβδομάδες. Κάθε πρωί, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία σπέρματος ή βύσματος από πηγμένο σπέρμα μέσα στον κόλπο. Η ημέρα 0 της εγκυμοσύνης ορίζεται, λαμβανομένης υπόψη της σπερματογένεσης, σαν ημέρα της ανεύρεσης πηγμένου σπέρματος ή σπέρματος.

Τα ζευγάρια εκείνα που δεν ζευγαρώνουν, πρέπει να εξετασθούν για να προσδιορισθεί η αιτία της φαινομενικής στειρότητας. Στην έρευνα αυτή περιλαμβάνονται διαδικασίες, όπως είναι η παροχή πρόσθετων ευκαιριών για ζευγάρωμα με άλλους αποδεδειγμένους πατέρες ή μητέρες, η μικροσκοπική εξέταση των αναπαραγωγικών οργάνων και η εξέταση του κύκλου οργασμού ή της σπερματογένεσης.

Αριθμός νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα

Τα ζώα που λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης γονιμότητας επιτρέπεται να γεννήσουν κανονικά και να μεγαλώσουν τα παιδιά τους μέχρι το στάδιο του απογαλακτισμού χωρίς ιδιαίτερη προτυποποίηση των νεογνών.

Εάν ακολουθηθεί η προτυποποίηση, προτείνεται η παρακάτω διαδικασία:

Μεταξύ της πρώτης και της τέταρτης ημέρας μετά τη γέννηση, ο αριθμός των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα μπορεί να διορθωθεί με την αφαίρεση των πλεοναζόντων νεογνών με επιλογή, έτσι ώστε να δημιουργηθούν όσο το δυνατόν πλησιέστερα τέσσερα αρσενικά και τέσσερα θηλυκά ανά ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα. Όταν α αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν επιτρέπει την ύπαρξη τεσσάρων νεογνών ανά φύλο σε κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα, είναι αποδεκτή η μερική διόρθωση (π.χ. 5 αρσενικά και 3 θηλυκά). Δεν γίνονται δεκτές διορθώσεις για ομάδες νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα και που περιλαμβάνουν λιγότερα από οκτώ νεογνά.

▼B

Παρατηρήσεις

Καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δοκιμασίας, κάθε ζώο πρέπει να παρατηρείται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα. Σχετικές μεταβολές στη συμπεριφορά, σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και όλα τα σημεία τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, πρέπει να καταγράφονται. Κατά τη διάρκεια των περιόδων πριν από το ζευγάρωμα και κατά το ζευγάρωμα, η κατανάλωση τροφής πρέπει να μετράται κάθε εβδομάδα. Μετά τον τοκετό, και κατά τη διάρκεια του θηλασμού, πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις κατανάλωσης τροφής καθώς επίσης και κατανάλωσης νερού, όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στο πόσιμο νερό, την ίδια ημέρα με τη ζύγιση των ομάδων νεογνών κάθε μητέρας. Οι αρσενικοί και θηλυκοί γονείς (Γ) θα πρέπει να ζυγίζονται κατά την πρώτη ημέρα της χορήγησης δόσεων και μετέπειτα κάθε εβδομάδα. Οι παρατηρήσεις πρέπει να καταγράφονται χωριστά για κάθε ενήλικο ζώο,

Η διάρκεια κυήσεως πρέπει να υπολογίζεται από την ημέρα 0 της εγκυμοσύνης. Κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατόν μετά τη γέννηση για να βρεθεί ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, ο αριθμός των θνησιγενών, ο αριθμός των ζωντανών και η παρουσία μακροσκοπικών ανωμαλιών.

Τα νεκρά νεογνά και τα νεογνά που θανατώθηκαν την τέταρτη ημέρα πρέπει να διατηρηθούν και να μελετηθούν για ενδεχόμενα ελαττώματα. Τα ζωντανά νεογνά θα πρέπει να μετρηθούν και οι ομάδες των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα να ζυγιστούν το επόμενο πρωί μετά τη γέννησή τους, καθώς επίσης την τέταρτη και έβδομη ημέρα, και μετέπειτα κάθε εβδομάδα μέχρι το τέλος της μελέτης, οπότε τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται χωριστά. Πρέπει να καταγράφονται οι φυσικές ανωμαλίες ή οι ανωμαλίες συμπεριφοράς που παρατηρούνται στις μητέρες ή στους απογόνους.

Παθολογική εξέταση

Νεκροψία

Κατά το χρόνο της θανάτωσης ή του θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, τα ζώα της γενεάς Γ θα πρέπει να εξετάζονται μακροσκοπικά για οποιεσδήποτε δομικές ανωμαλίες ή παθολογικές μεταβολές, με ιδιαίτερη έμφαση στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα νεκρά ή ετοιμοθάνατα νεογνά θα πρέπει να εξετάζονται για ελαττώματα.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Οι ωοθήκες, η μήτρα, ο τράχηλος, ο κόλπος, οι όρχεις, η επιδιδυμίδα, η σπερματοδόχος κύστη, ο προστάτης, ο πηκτικός αδένας, η υπόφυση και τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης όλων των ζώων της γενεάς Γ, πρέπει να διατηρηθούν για μικροσκοπική εξέταση. Στη σπάνια περίπτωση που τα όργανα αυτά δεν έχουν εξετασθεί σε άλλες μελέτες πολλαπλών δόσεων, πρέπει να εξετασθούν μικροσκοπικά σε όλα τα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης και ομάδας μάρτυρα και, εφόσον είναι δυνατόν, στα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Τα όργανα που παρουσιάζουν ανωμαλίες στα ζώα αυτά πρέπει εν συνεχεία να εξετασθούν σε όλα τα ζώα της γενεάς Γ. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να γίνει μικροσκοπική εξέταση σε όλους τους ιστούς που παρουσιάζουν μακροσκοπικές παθολογικές μεταβολές. Όπως προτάθηκε στις διαδικασίες ζευγαρώματος, τα αναπαραγωγικά όργανα των ζώων που είναι ύποπτα στειρότητας, μπορεί να υποβληθούν σε μικροσκοπική εξέταση.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα μπορούν να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των γόνιμων αρσενικών, Τον αριθμό των έγκυων θηλυκών, τον τύπο των μεταβολών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο μεταβολής. Εφόσον είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει επίσης να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος/ποικιλία ζώου που χρησιμοποιήθηκε,

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένης της γονιμότητας, κυοφορίας και βιωσιμότητας,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια τη; μελέτης ή, αν τα ζώα επέζησαν, χρόνο προγραμματισμένης θανάτωσης για τον τερματισμό της μελέτης,

— πίνακα που παρουσιάζει το βάρος κάθε ομάδας νεογνών που γεννήθηκαν από κάθε μητέρα, το μέσο βάρος νεογνών, και το ατομικό βάρος των νεογνών κατά το τέλος της μελέτης,

— τοξικέ ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, στους απογόνους, στην ανάπτυξη μετά τη γέννηση κ.λπ.,

— ημέρα παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,

— στοιχεία βάρους του σώματος για τα ζώα της γενεάς Γ,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερή περιγραφή των μικροσκοπικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εφόσον χρειάζεται,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

▼B

B.35. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΥΟ ΓΕΝΕΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αναπαραγωγή της OECD TG 416 (2001).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής στην αναπαραγωγή δύο γενεών σχεδιάστηκε για την παροχή γενικών πληροφοριών σχετικά με τα αποτελέσματα μιας υπό δοκιμή ουσίας στην ακεραιότητα και συμπεριφορά των αναπαραγωγικών συστημάτων αρσενικών και θηλυκών, συμπεριλαμβανομένης της λειτουργίας των γονάδων, του κύκλου του οίστρου, των επιδόσεων στο ζευγάρωμα, της σύλληψης, της κύησης, του τοκετού, της γαλουχίας και του απογαλακτισμού, καθώς και της αύξησης και ανάπτυξης των γόνων. Η μελέτη μπορεί επίσης να παράσχει πληροφορίες και για τις επιδράσεις της υπό δοκιμή ουσίας στη νοσηρότητα των νεογνών, τη θνησιμότητα, καθώς και προκαταρκτικά στοιχεία για την προ- και μεταγεννητική τοξικότητα στην ανάπτυξη και να χρησιμεύσει ως οδηγός για μεταγενέστερες δοκιμές. Εκτός από τη μελέτη της αύξησης και ανάπτυξης της γενεάς F1, η παρούσα μέθοδος δοκιμής αποσκοπεί και στην αξιολόγηση της ακεραιότητας και συμπεριφοράς των αρσενικών και θηλυκών συστημάτων αναπαραγωγής, καθώς και της αύξησης και ανάπτυξης της γενεάς F2. Για περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα στην ανάπτυξη και τις λειτουργικές ανεπάρκειες μπορεί, ή στο παρόν πρωτόκολλο να ενταχθούν πρόσθετα τμήματα μελέτης, στηριζόμενα, ανάλογα, στις μεθόδους για την τοξικότητα και/ή την νευροτοξικότητα στην ανάπτυξη, ή τα τελικά αυτά σημεία μπορούν να μελετηθούν σε ξεχωριστές μελέτες, χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες μεθόδους δοκιμής.

1.2 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται σε διαβαθμισμένες δόσεις σε ορισμένες ομάδες αρσενικών και θηλυκών. Στα αρσενικά της γενεάς P η χορήγηση θα πρέπει να γίνεται κατά τη διάρκεια της αύξησης και για ένα τουλάχιστον πλήρη σπερματογενετικό κύκλο (περίπου 56 ημέρες στους ποντικούς και 70 ημέρες στους επίμυες) για τη διαπίστωση τυχόν δυσμενών επιδράσεων στη σπερματογένεση. Οι επιδράσεις στο σπέρμα προσδιορίζονται από έναν αριθμό παραμέτρων του σπέρματος (π.χ., μορφολογία και κινητικότητα του σπέρματος) και στην παρασκευή και λεπτομερή ιστοπαθολογία του ιστού. Εάν, από προηγούμενη μελέτη επαναλαμβανόμενων δόσεων ικανής διάρκειας, υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για τη σπερματογένεση, π.χ. κάποια μελέτη 90 ημερών, τα αρσενικά της γενεάς P δεν χρειάζεται να περιληφθούν στην αξιολόγηση. Συνιστάται, ωστόσο, δείγματα ή ψηφιακές καταγραφές σπέρματος της γενεάς P να φυλάσσονται, για να μπορεί να γίνει αργότερα αξιολόγηση. Στα θηλυκά της γενεάς P θα πρέπει να γίνεται χορήγηση κατά τη διάρκεια της αύξησης και για μερικούς πλήρεις κύκλους οίστρου για τον εντοπισμό τυχόν δυσμενών επιδράσεων στην κανονικότητα του κύκλου από την υπό δοκιμή ουσία. Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται σε γονικά ζώα (P) κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματός τους, κατά τη διάρκεια της επακολουθούσης κυήσεως και μέχρι τον απογαλακτισμό των γόνων τους F1. Στον απογαλακτισμό, η χορήγηση της ουσίας συνεχίζεται στους γόνους F1 κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους σε ενήλικα άτομα, στο ζευγάρωμα και στην παραγωγή της γενεάς F2, μέχρις ότου η γενεά F2 απογαλακτιστεί.

Σε όλα τα ζώα γίνονται κλινικές παρατηρήσεις και παθολογικές εξετάσεις για τυχόν σημεία τοξικότητας με ιδιαίτερη έμφαση σε επιδράσεις στην ακεραιότητα και επιδόσεις των αρσενικών και θηλυκών αναπαραγωγικών συστημάτων και στην αύξηση και ανάπτυξη των γόνων.

▼B

1.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.3.1 **Επιλογή του είδους του ζώου**

Για τις δοκιμές προτιμώνται οι επίμυες. Εφόσον χρησιμοποιηθεί άλλο είδος, θα πρέπει να δίδεται σχετική αιτιολόγηση και να επιφέρονται οι κατάλληλες αναγκαίες τροποποιήσεις. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. φυλές με χαμηλή γονιμότητα ή γνωστή υψηλή συχνότητα εμφάνισης αναπτυξιακών ελαττωμάτων. Κατά την έναρξη της μελέτης, οι διακυμάνσεις στα βάρη των χρησιμοποιούμενων ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου.

1.3.2 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία στο θάλαμο πειραματισμού των ζώων θα πρέπει να είναι 22 ºC (± 3º). Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 % εκτός κατά τη διάρκεια του καθαρισμού του θαλάμου, στόχος θα πρέπει να είναι μια υγρασία 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή 12 ωρών φωτός και 12 ωρών σκότους. Για τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά διαιτολόγια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Η επιλογή του διαιτολογίου μπορεί να εξαρτηθεί από την ανάγκη διασφάλισης κατάλληλου προσμείγματος της υπό δοκιμή ουσίας όταν χορηγείται με τη μέθοδο αυτή.

Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται κατ' άτομο ή να είναι σε κλουβιά σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου. Οι διαδικασίες του ζευγαρώματος θα πρέπει να γίνονται σε κλουβιά κατάλληλα για το σκοπό αυτό. Μετά τη συνουσία, τα ζευγαρωμένα θηλυκά πρέπει να τοποθετούνται μόνα τους σε κλουβιά τοκετού ή μητρότητας. Οι ζευγαρωμένοι επίμυες μπορούν, επίσης, να στεγάζονται σε μικρές ομάδες και να χωρίζονται μια ή δύο ημέρες πριν από τον τοκετό. Στα ζευγαρωμένα ζώα πρέπει να παρέχονται κατάλληλα και καθορισμένα υλικά δημιουργίας φωλιών όταν πλησιάζει ο τοκετός.

1.3.3 **Προετοιμασία των ζώων**

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ζώα, τα οποία να έχουν εγκλιματιστεί στις εργαστηριακές συνθήκες για 5 ημέρες τουλάχιστον και να μην έχουν υποβληθεί σε προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες. Τα υπό δοκιμή ζώα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, τη φυλή, την προέλευση, το φύλο, το βάρος και/ή την ηλικία. Αν κάποια από τα ζώα είναι αμφιθαλή, αυτό θα πρέπει να είναι γνωστό για να αποφεύγεται το ζευγάρωμα αμφιθαλών ατόμων. Τα ζώα θα πρέπει να εντάσσονται με τυχαίο τρόπο στις ομάδες μαρτυρίας και δοκιμής (συνιστάται η διαβάθμιση κατά σωματικό βάρος). Τα κλουβιά θα πρέπει να τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται το ενδεχόμενο επιδράσεων λόγω της θέσης των κλουβιών. Σε κάθε ζώο θα πρέπει να δίνεται ένας αποκλειστικός αριθμός αναγνώρισης. Για τη γενεά P, αυτό θα πρέπει να γίνεται πριν από την έναρξη της χορήγησης. Για τη γενεά F1, αυτό θα πρέπει να γίνεται στον απογαλακτισμό σε ζώα που επιλέγονται για ζευγάρωμα. Για όλα τα επιλεγόμενα ζώα F1, θα πρέπει να τηρούνται αρχεία εμφαίνοντα τη γέννα προέλευσης. Επιπλέον, συνιστάται η κατ' άτομο αναγνώριση των νεογνών αμέσως μετά τη γέννηση, εφόσον προβλέπεται το ατομικό ζύγισμα των νεογνών ή τυχόν λειτουργικές δοκιμές.

Τα γονικά (P) ζώα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 5 έως 9 εβδομάδων κατά την έναρξη της χορήγησης. Τα ζώα όλων των ομάδων δοκιμής πρέπει, κατά το δυνατόν, να έχουν ομοιόμορφο βάρος και ηλικία.

▼B

1.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.4.1 **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Κάθε ομάδα δοκιμής και μαρτυρίας θα πρέπει να περιλαμβάνει ικανό αριθμό ζώων ώστε τα έγγυα θηλυκά ζώα που θα φθάσουν σε τοκετό ή πλησίον του τοκετού να μην είναι, κατά προτίμηση, λιγότερα από 20. Στην περίπτωση ουσιών που προκαλούν ανεπιθύμητα αποτελέσματα σχετιζόμενα με την αγωγή (π.χ. στειρότητα, υπερβολική τοξικότητα στην υψηλή δόση), αυτό μπορεί να μην είναι δυνατόν. Στόχος είναι η επίτευξη Ικανού αριθμού κυήσεων ώστε να διασφαλιστεί η με σημαντικότητα αξιολόγηση των δυνατοτήτων της ουσίας να επηρεάσει τη γονιμότητα, την κύηση και τη μητρική συμπεριφορά και θηλασμό, την αύξηση και ανάπτυξη των γόνων F1 από τη σύλληψη μέχρι την ωριμότητα, και την ανάπτυξη των γόνων τους (F2) μέχρι τον απογαλακτισμό. Συνεπώς, τυχόν αδυναμία επίτευξης του επιθυμητού αριθμού εγγύων ζώων (δηλαδή 20) δεν ακυρώνει, κατ' ανάγκη, τη μελέτη και θα πρέπει να αξιολογείται κατά περίπτωση.

1.4.2 **Ετοιμασία των δόσεων**

Συνιστάται η υπό δοκιμή ουσία να χορηγείται από το στόμα (με την τροφή, το πόσιμο νερό ή με διασωλήνωση), εκτός κι αν θεωρείται ως καταλληλότερη κάποια άλλη οδός χορήγησης (π.χ. από το δέρμα ή με εισπνοή).

Όταν είναι αναγκαίο, η υπό δοκιμή ουσία διαλύεται ή λαμβάνει τη μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται, οσάκις είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα χρήσης υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, κατόπιν το ενδεχόμενο διαλύματος/γαλακτώματος σε λάδι (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και, τέλος, η χρήση διαλύματος σε άλλους φορείς. Για φορείς άλλους εκτός από το νερό, πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά του φορέα. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο φορέα.

1.4.3 **Δοσολογία**

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και ένας συντρέχων μάρτυρας. Εκτός κι αν υπάρχουν περιορισμοί λόγω της φυσικής/χημικής φύσεως ή των βιολογικών ιδιοτήτων της υπό δοκιμή ουσίας, η μέγιστη δόση θα πρέπει να επιλέγεται με στόχο να προκαλεί κάποια τοξική δράση αλλά όχι θάνατο ή σοβαρή ταλαιπωρία. Σε περίπτωση μη αναμενόμενης θνησιμότητας, μελέτες με δείκτη θνησιμότητας μικρότερο από το 10 % περίπου στα γονικά (P) ζώα είναι κανονικά αποδεκτές. Θα πρέπει να επιλέγεται μια φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσεων με σκοπό την κατάδειξη κάθε απόκρισης σχετικής με τη δοσολογία και του επιπέδου μη παρατήρησης δυσμενών επιδράσεων (NOAEL). Για τη διαμόρφωση της φθίνουσας σειράς επιπέδων δόσεων, ο καλύτερος συχνά τρόπος είναι η χρησιμοποίηση διπλών ή τετραπλών διαστημάτων, ενώ η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι συχνά προτιμότερη από τη χρησιμοποίηση πολύ μεγάλων διαστημάτων (π.χ. με συντελεστή άνω του 10) μεταξύ των δόσεων. Για τις μελέτες διατροφής, το μεταξύ των δόσεων διάστημα δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το τριπλάσιο. Τα επίπεδα των δόσεων θα πρέπει να επιλέγονται λαμβάνοντας υπόψη όλα τα υφιστάμενα δεδομένα τοξικότητας, ιδιαίτερα αποτελέσματα από μελέτες επαναλαμβανόμενης δοσολογίας. Θα πρέπει, επίσης, να εξετάζεται κάθε διαθέσιμη πληροφορία για το μεταβολισμό και την κινητική της υπό δοκιμή ουσίας ή συναφών ουσιών. Επιπλέον, οι πληροφορίες αυτές βοηθούν και στην κατάδειξη της καταλληλότητας της δοσολογικής αγωγής.

▼B

Η ομάδα μαρτυρίας πρέπει να είναι ομάδα ζώων μη υποβληθέντων σε αγωγή ή ομάδα ζώων που υποβλήθηκαν σε αγωγή με φορέα εφόσον, για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας, χρησιμοποιείται φορέας. Πλην της αγωγής με την υπό δοκιμή ουσία, τα ζώα στην ομάδα μαρτυρίας θα πρέπει να έχουν την ίδια ακριβώς μεταχείριση με εκείνη των ζώων της ομάδας δοκιμής. Εάν χρησιμοποιείται φορέας, η χορήγηση του φορέα θα πρέπει να γίνεται στο μέγιστο χρησιμοποιούμενο όγκο. Εάν μια υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με την τροφή και προκαλεί μειωμένη λήψη ή χρήση τροφής, τότε μπορεί να κριθεί ως αναγκαία η χρήση ομάδας μαρτύρων διατρεφομένων σε ζεύγη. Εναλλακτικώς, αντί της χρησιμοποίησης συντρέχουσας ομάδας μαρτύρων διατροφής σε ζεύγη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στοιχεία από μελέτες μαρτυρίας σχεδιασμένες για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μειωμένης κατανάλωσης τροφής στις παραμέτρους της αναπαραγωγής.

Θα πρέπει να δίδεται προσοχή στα ακόλουθα χαρακτηριστικά του φορέα και άλλων προσθέτων: επιδράσεις στην απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό ή την κατακράτηση της υπό δοκιμή ουσίας, επιδράσεις στις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας που μπορεί να μεταβάλουν τις τοξικές της ιδιότητες και επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή της διατροφικής κατάστασης των ζώων.

1.4.4 **Δοκιμή ορίου**

Εάν δοκιμή με-ένα μοναδικό επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα από το στόμα ή, στην περίπτωση χορήγησης με την τροφή ή το πόσιμο νερό, με ισοδύναμο ποσοστό ουσίας στην τροφή ή στο πόσιμο νερό και χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται για την παρούσα μελέτη, δεν εμφανίζει κάποια αντιληπτή τοξική δράση στα γονικά ζώα ή στους γόνους τους και εφόσον, από τα υφιστάμενα δεδομένα από ουσίες με παρόμοια δομή και/ή μεταβολισμό, δεν αναμένεται η εμφάνιση τέτοιας δράσης, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η διενέργεια πλήρους μελέτης με διάφορα επίπεδα δόσεων. Η δοκιμή ορίου εφαρμόζεται εκτός όταν, από την έκθεση του ανθρώπου, διαφαίνεται η ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης από το στόμα. Σε άλλους τρόπους χορήγησης, όπως η εισπνοή ή η δερματική επίθεση, από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας όπως π.χ. η διαλυτότητα μπορεί, συχνά, να υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ή περιορισμοί ως προς το μέγιστο εφικτό επίπεδο έκθεσης.

1.4.5 **Χορήγηση δόσεων**

Η χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας στα ζώα θα πρέπει να γίνεται σε επταήμερη βάση εβδομαδιαίως. Ως οδός χορήγησης προτιμάται η χορήγηση από το στόμα (τροφή, πόσιμο νερό ή διασωλήνωση). Εάν χρησιμοποιηθεί κάποια άλλη οδός χορήγησης, θα πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση και να επιφέρονται οι αναγκαίες κατάλληλες τροποποιήσεις. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου, η χορήγηση, σε όλα τα ζώα θα πρέπει να γίνεται με την ίδια μέθοδο. Οταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με διασωλήνωση, αυτό θα πρέπει να γίνεται χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα. Ο όγκος του υγρού που χορηγείται κάθε φορά δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος (στην περίπτωση του αραβοσιτελαίου, το μέγιστο είναι 0,4 ml/100 g βάρους σώματος), εκτός στην περίπτωση υδατικών διαλυμάτων όπου μπορεί να χρησιμοποιηθούν 2 ml/100 g βάρους σώματος. Εκτός στην περίπτωση ερεθιστικών ή διαβρωτικών ουσιών, οι οποίες κανονικά εμφανίζουν αυξημένη δράση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διακυμάνσεις στον όγκο δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση έτσι ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσεων. Σε μελέτες με διασωλήνωση, τα νεογνά λαμβάνουν κανονικά υπό δοκιμή ουσία μόνον εμμέσως μέσω του γάλακτος, μέχρις ότου αρχίσει η απευθείας χορήγηση γι' αυτά στον απογαλακτισμό. Σε μελέτες με τροφή ή πόσιμο νερό, τα νεογνά λαμβάνουν επιπροσθέτως υπό δοκιμή ουσία απευθείας όταν αρχίζουν να τρώνε μόνα τους κατά τη διάρκεια της τελευταίας εβδομάδας της περιόδου της γαλουχίας.

▼B

Για ουσίες που χορηγούνται μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, είναι σημαντικό να διασφαλίζεται οι ποσότητες της χορηγούμενης υπό δοκιμή ουσίας να μη παρεμβαίνουν στο κανονικό ισοζύγιο διατροφής ή νερού. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με την τροφή, μπορεί να χρησιμοποιείται είτε μια σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (ppm) είτε ένα σταθερό επίπεδο δόσης βάσει σωματικού βάρους του ζώου. Τυχόν χρησιμοποιούμενος εναλλακτικός τρόπος πρέπει να προσδιορίζεται. Στην περίπτωση ουσίας που χορηγείται με διασωλήνωση, η δόση θα πρέπει να δίνεται τις ίδιες ώρες κάθε μέρα και να προσαρμόζεται τουλάχιστον κάθε εβδομάδα ώστε να διατηρείται ένα σταθερό επίπεδο δόσης βάσει του σωματικού βάρους του ζώου. Κατά την προσαρμογή της με διασωλήνωση δόσεως με βάση το βάρος, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τυχόν στοιχεία σχετικά με την κατανομή στον πλακούντα.

1.4.6 **Χρονοδιαγράμματα πειραμάτων**

Η καθημερινή χορήγηση στα γονικά (P) αρσενικά και θηλυκά πρέπει να αρχίζει όταν είναι ηλικίας 5 έως 9 εβδομάδων. Η καθημερινή χορήγηση στα αρσενικά και θηλυκά F1 πρέπει να αρχίζει στον απογαλακτισμό. Πρέπει να έχουμε κατά νου ότι στις περιπτώσεις χορήγησης της υπό δοκιμή ουσίας μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, ενδέχεται να συμβαίνει ήδη κατά τη διάρκεια της περιόδου της γαλουχίας απευθείας έκθεση των νεογνών F1 στην υπό δοκιμή ουσία. Και για τα δύο φύλα (P και F1), η χορήγηση πρέπει να συνεχίζεται για 10 τουλάχιστον εβδομάδες πριν από την περίοδο του ζευγαρώματος. Η χορήγηση συνεχίζεται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια της περιόδου των 2 εβδομάδων του ζευγαρώματος. Τα αρσενικά θα πρέπει να θανατώνονται ανθρωπιστικά και να εξετάζονται όταν δεν χρειάζονται πλέον για εκτίμηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή. Για τα γονικά (P) θηλυκά, η χορήγηση θα πρέπει να συνεχίζεται καθ' όλη την κύηση και μέχρι τον απογαλακτισμό των γόνων F1. Θα πρέπει να εξετάζεται η τυχόν πραγματοποίηση τροποποιήσεων στο χρονοδιάγραμμα χορήγησης με βάση διαθέσιμες πληροφορίες για την υπό δοκιμή ουσία, συμπεριλαμβανομένων των υφισταμένων δεδομένων τοξικότητας, μεταβολισμού ή βιοσυσσώρευσης. Η δόση σε κάθε ζώο θα πρέπει κανονικά να βασίζεται στον πλέον πρόσφατο κατ' άτομο προσδιορισμό του σωματικού βάρους. Ωστόσο, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή όταν η δόση προσαρμόζεται κατά τη διάρκεια του τελευταίου τριμήνου της κυήσεως.

Η χορήγηση στα αρσενικά και θηλυκά P και F1 πρέπει να συνεχίζεται μέχρι τέλους. Όλα τα ενήλικα αρσενικά και θηλυκά P και F1 θα πρέπει να θανατώνονται ανθρωπιστικά όταν δεν χρειάζονται πλέον για εκτίμηση των αποτελεσμάτων στην αναπαραγωγή. Οι γόνοι F1 που δεν επιλέγονται για ζευγάρωμα και όλοι οι γόνοι F2 θα πρέπει να θανατώνονται ανθρωπιστικά μετά τον απογαλακτισμό.

1.4.7 **Διαδικασία ζευγαρώματος**

1.4.7.1 *Ζευγάρωμα γονικών ατόμων (P)*

Σε κάθε ζευγάρωμα, κάθε θηλυκό πρέπει να τοποθετείται μαζί με ένα μόνο αρσενικό από το ίδιο επίπεδο δόσεως (ζευγάρωμα 1:1) μέχρι να υπάρξει συνουσία ή μέχρι να περάσουν 2 εβδομάδες. Κάθε μέρα, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για παρουσία σπέρματος ή κολπικών βυσμάτων. Ως ημέρα 0 της κυήσεως ορίζεται η ημέρα κατά την οποία θα βρεθεί κολπικό βύσμα ή σπέρμα. Σε περίπτωση που το ζευγάρωμα αποδειχθεί ανεπιτυχές, πρέπει να εξετάζεται το ξαναζευγάρωμα των θηλυκών με ελεγμένα αρσενικά της ίδιας ομάδας. Στα δεδομένα, τα ζεύγη που ζευγάρωσαν θα πρέπει να αναγνωρίζονται σαφώς. Θα πρέπει να αποφεύγεται το ζευγάρωμα αμφιθαλών ατόμων.

▼B

1.4.7.2 *Ζευγάρωμα F1*

Για το ζευγάρωμα των γόνων F1, θα πρέπει να επιλέγονται τουλάχιστον ένα αρσενικό και ένα θηλυκό στον απογαλακτισμό από κάθε γέννα για ζευγάρωμα με άλλα νεογνά του ίδιου επιπέδου δόσεως αλλά διαφορετικής γέννας, για τη λήψη της γενεάς F2. Η επιλογή νεογνών από κάθε γέννα θα πρέπει να είναι τυχαία όταν δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στο βάρος του σώματος ή στην εμφάνιση μεταξύ των ατόμων της γέννας. Στην περίπτωση που παρατηρούνται τέτοιες διαφορές, θα πρέπει να επιλέγονται οι καλύτεροι εκπρόσωποι κάθε γέννας. Αντικειμενικά, αυτό επιτυγχάνεται καλύτερα με βάση το βάρος του σώματος, μπορεί όμως να είναι σκοπιμότερο να γίνεται βάσει εμφανίσεως. Οι γόνοι F1 δεν θα πρέπει να ζευγαρώνονται μέχρι να έλθουν σε πλήρη σεξουαλική ωρίμανση.

Τα χωρίς απογόνους ζεύγη θα πρέπει να αξιολογούνται για να προσδιορίζεται η προφανής αιτία της μη γονιμότητας. Αυτό μπορεί να γίνει με διαδικασίες όπως η παροχή πρόσθετων ευκαιριών για ζευγάρωμα με άλλα αρσενικά ή θηλυκά, μικροσκοπική εξέταση των οργάνων αναπαραγωγής και εξέταση των κύκλων οίστρου ή σπερματογένεσης.

1.4.7.3 *Δεύτερο ζευγάρωμα*

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στην περίπτωση αλλαγών στο μέγεθος της γέννας λόγω της αγωγής ή παρατήρησης διφορούμενου αποτελέσματος στο πρώτο ζευγάρωμα, συνιστάται τα ενήλικα P ή F1 να ξαναζευγαρώνονται για τη λήψη δεύτερης γέννας. Συνιστάται να ξαναζευγαρώνονται θηλυκά ή αρσενικά, τα οποία να μην έχουν δώσει γέννα με αποδεδειγμένους γεννήτορες του αντίθετου φύλου. Εάν και στις δύο γενεές κριθεί αναγκαία η λήψη δεύτερης γέννας, τα ζώα θα πρέπει να ξαναζευγαρώνονται περίπου μια εβδομάδα μετά τον απογαλακτισμό της τελευταίας γέννας.

1.4.7.4 *Μέγεθος γέννας*

Τα ζώα πρέπει να αφήνονται να γεννούν κανονικά και να μεγαλώνουν τους γόνους τους μέχρι τον απογαλακτισμό. Η τυποποίηση των μεγεθών των γεννών είναι προαιρετική. Όταν πραγματοποιείται τυποποίηση, η χρησιμοποιούμενη μέθοδος θα πρέπει να περιγράφεται λεπτομερώς.

1.5 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1.5.1 **Κλινικές παρατηρήσεις**

Κάθε μέρα θα πρέπει να πραγματοποιείται γενική κλινική παρατήρηση ενώ, στην περίπτωση χορήγησης με διασωλήνωση, για το χρόνο πραγματοποίησής της θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η προβλεπόμενη περίοδος κορύφωσης των επιδράσεων μετά τη χορήγηση. Θα πρέπει να καταγράφονται τυχόν αλλαγές στη συμπεριφορά, σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και κάθε σημάδι τοξικότητας. Σε εβδομαδιαία, τουλάχιστον, βάση θα πρέπει να διεξάγεται μια πρόσθετη, λεπτομερέστερη εξέταση κάθε ζώου, η οποία μπορεί να γίνεται για ευκολία με την ευκαιρία της ζύγισης του ζώου. Δύο φορές ημερησίως και κατά τη διάρκεια του σαββατοκύριακου άπαξ ημερησίως εφόσον δεν τίθεται πρόβλημα, όλα τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται για νοσηρότητα και θνησιμότητα.

▼B

1.5.2 **Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής/νερού από τους γονείς**

Τα γονικά ζώα (P και F1) πρέπει να ζυγίζονται την πρώτη ημέρα της χορήγησης και κάθε εβδομάδα τουλάχιστον στη συνέχεια. Τα γονικά θηλυκά (P και F1) πρέπει να ζυγίζονται τουλάχιστον κατά τις ημέρες 0, 7, 14 και 20 ή 21 της κυήσεως και κατά τη διάρκεια της γαλουχίας τις ίδιες ημέρες με το ζύγισμα των νεογνών και κατά την ημέρα που θανατώνονται τα ζώα. Οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να αναφέρονται ξεχωριστά για κάθε ενήλικο ζώο. Κατά τη διάρκεια των περιόδων πριν από το ζευγάρωμα και κατά την κύηση θα πρέπει να μετριέται τουλάχιστον κάθε εβδομάδα η κατανάλωση τροφής. Η κατανάλωση νερού πρέπει να μετριέται κάθε βδομάδα τουλάχιστον εάν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με το νερό.

1.5.3 **Κύκλος οίστρου**

Το μήκος και η κανονικότητα του κύκλου του οίστρου αξιολογούνται στα θηλυκά P και F1 από τα κολπικά επιχρίσματα πριν από το ζευγάρωμα και, προαιρετικώς, κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος μέχρι να βρεθεί ότι έγινε το ζευγάρωμα. Όταν λαμβάνονται κολπικά/τραχηλικά κύτταρα, θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια να αποφεύγεται τυχόν διαταραχή στους βλεννογόνους και η πρόκληση, κατά συνέπεια, ψευδοκυήσεως (1).

1.5.4 **Παράμετροι σπέρματος**

Για όλα τα αρσενικά P και F1 στο τέλος της μελέτης, πρέπει να καταγράφεται το βάρος των όρχεων και των επιδιδυμίδων και ένα από κάθε όργανο να κρατιέται για ιστοπαθολογική εξέταση (βλέπε τμήμα 1.5.7, 1.5.8.1). Από υποσύνολο δέκα τουλάχιστον αρσενικών από κάθε ομάδα P και F1 αρσενικών, οι απομένοντες όρχεις και επιδιδυμίδες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την καταμέτρηση των ανθεκτικών στην ομοιογενοποίηση σπερμοβλαστών και σπερματικού αποθέματος της ουράς της επιδιδυμίδας, αντίστοιχα. Από το ίδιο υποσύνολο αρσενικών, θα πρέπει να συλλέγεται για εκτίμηση της κινητικότητας και μορφολογίας των σπερματοζωαρίων, σπέρμα από την ουρά της επιδιδυμίδος ή από τον σπερματικό πόρο. Εάν παρατηρούνται επιδράσεις σχετικές με την αγωγή ή όταν υπάρχουν ενδείξεις από άλλες μελέτες για πιθανές επιδράσεις στη σπερματογένεση, θα πρέπει να διεξάγεται αξιολόγηση σπέρματος σε όλα τα αρσενικά σε κάθε ομάδα δόσης. Άλλως, η καταμέτρηση μπορεί να περιοριστεί στα αρσενικά P και F1 των ομάδων μαρτυρίας και υψηλής δόσης.

Θα πρέπει να μετριέται ο συνολικός αριθμός των ανθεκτικών σε ομοιογενοποίηση ορχικών σπερματιδών και σπερματοζωαρίων της ουράς της επιδιδυμίδος (2)(3). Τα αποθέματα σπέρματος της ουράς μπορεί να προέρχονται από τη συγκέντρωση και όγκο σπέρματος στο εναιώρημα που χρησιμοποιείται για την ολοκλήρωση των ποιοτικών αξιολογήσεων και από τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που ανακτώνται από εν συνεχεία κατατεμαχισμό και/ή ομοιογενοποίηση του παραμένοντος ιστού ουράς. Η καταμέτρηση θα πρέπει να γίνεται στο επιλεγμένο υποσύνολο αρσενικών όλων των δοσολογικών ομάδων αμέσως μετά τη θανάτωση των ζώων εκτός κι αν γίνουν οπτικές ή ψηφιακές καταγραφές ή αν τα δοκίμια καταψυχθούν και αναλυθούν αργότερα. Στις περιπτώσεις αυτές, οι μάρτυρες και η ομάδα υψηλής δόσης μπορεί να αναλυθούν πρώτα. Εάν δεν εντοπιστούν φαινόμενα επιδράσεων προερχομένων από την αγωγή (π.χ. επιδράσεις στον αριθμό των σπερματοζωαρίων, στην κινητικότητα ή στη μορφολογία), οι υπόλοιπες δοσολογικές ομάδες δεν χρειάζεται να αναλυθούν. Όταν στην ομάδα υψηλής δόσης εντοπίζονται σημεία επιδράσεων σχετικών με την αγωγή, τότε θα πρέπει να αξιολογούνται και οι ομάδες με χαμηλότερη δόση.

▼B

Αμέσως μετά τη θυσία θα πρέπει να αξιολογείται ή να βιντεοσκοπείται η κινητικότητα του σπέρματος της επιδιδυμίδος (ή του σπερματικού πόρου). Το σπέρμα θα πρέπει να ανακτάται με τις μικρότερες δυνατές ζημιές και να αραιώνεται για ανάλυση κινητικότητας χρησιμοποιώντας αποδεκτές μεθόδους (4). Θα πρέπει να προσδιορίζεται, είτε υποκειμενικώς είτε αντικειμενικώς, το ποσοστό των προοδευτικώς αυθορμήτως κινουμένων σπερματοζωαρίων. Οταν εκτελείται υποβοηθούμενη από υπολογιστή ανάλυση κινήσεως (5)(6)(7)(8)(9)(10), η παραγωγοποίηση της προοδευτικής κινητικότητας εξαρτάται από τα καθοριζόμενα από το χρήστη κατώφλια μέσης ταχύτητας διαδρομής και ευθύτητας ή γραμμικού δείκτη. Εάν τα δείγματα βιντεοσκοπηθούν (11) ή οι εικόνες καταγραφούν με κάποιον άλλο τρόπο κατά το χρόνο της νεκροψίας, μπορεί στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί ανάλυση μόνον των ομάδων μαρτυρίας και υψηλής δόσεως των αρσενικών P και F1 εκτός κι αν παρατηρηθούν σχετικές με την αγωγή επιδράσεις. Στην τελευταία περίπτωση, θα πρέπει να αξιολογηθούν και οι ομάδες με χαμηλότερη δόση. Αν δεν υπάρχει βιντεοσκοπημένη ή ψηφιακή εικόνα, όλα τα δείγματα σε όλες τις ομάδες αγωγής θα πρέπει να αναλυθούν στη νεκροψία.

Θα πρέπει να εκτελείται μορφολογική αξιολόγηση δείγματος σπέρματος της επιδιδυμίδος (ή του σπερματικού πόρου). Το σπέρμα (200 τουλάχιστον σπερματοζωάρια ανά δείγμα) θα πρέπει να εξετάζεται ως σταθεροποιημένο, υγρό παρασκεύασμα (12) και να ταξινομείται ως κανονικό ή μη κανονικό. Παραδείγματα μορφολογικών ανωμαλιών των σπερματοζωαρίων είναι η σύντηξη, η ύπαρξη απομονωμένων κεφαλών και η ύπαρξη παραμορφωμένων κεφαλών και/ή ουρών. Η αξιολόγηση θα πρέπει να γίνεται στο επιλεγμένουποσύνολο αρσενικών όλων των δοσολογίκών ομάδων είτε αμέσως μετά τη θανάτωση των ζώων, είτε με βάση τις βιντεοσκοπημένες ή ψηφιακές καταγραφές σε κάποιο μεταγενέστερο χρόνο. Επιχρίσματα, εφόσον στερεωθούν, μπορούν και αυτά να εξεταστούν σε κάποιο μεταγενέστερο χρόνο. Στις περιπτώσεις αυτές, οι μάρτυρες και η ομάδα υψηλής δόσης μπορούν να αναλυθούν πρώτα. Εάν δεν εντοπιστούν επιδράσεις σχετικές με την αγωγή (π.χ. επιδράσεις στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων), δεν χρειάζεται να αναλυθούν οι υπόλοιπες δοσολογικές ομάδες. Όταν στην ομάδα υψηλής δόσης εντοπιστούν επιδράσεις σχετιζόμενες με την αγωγή, τότε θα πρέπει να αξιολογούνται και οι ομάδες με χαμηλότερη δόση.

Εάν οποιαδήποτε από τις ανωτέρω παραμέτρους αξιολόγησης του σπέρματος έχουν ήδη εξεταστεί ως τμήμα μελέτης συστεμικής τοξικότητας τουλάχιστον 90 ημερών, δεν χρειάζεται κατ' ανάγκη να επαναληφθούν στη μελέτη δύο γενεών. Συνιστάται, ωστόσο, να φυλαχθούν δείγματα ή ψηφιακές καταγραφές σπέρματος της γενεάς P, για να μπορεί να γίνει αργότερα, αν χρειάζεται, αξιολόγηση.

1.5.5 **Γόνοι**

Κάθε γέννα θα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατό μετά τον τοκετό (ημέρα γαλουχίας 0) για να προσδιορίζεται ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, τα γεννηθέντα νεκρά, τα γεννηθέντα ζώντα και αν υπάρχουν μακροσκοπικές ανωμαλίες. Τα νεογνά που βρέθηκαν νεκρά την ημέρα 0, αν δεν βραχούν, θα πρέπει κατά προτίμηση να εξετάζονται για πιθανά ελαττώματα και για την αιτία θανάτου και να συντηρούνται. Τα ζώντα νεογνά θα πρέπει να καταμετρώνται και να ζυγίζονται κατ' άτομο με τη γέννηση (ημέρα γαλουχίας 0) ή την 1η ημέρα, και στη συνέχεια σε τακτές ημέρες ζύγισης, π.χ., τις ημέρες 4, 7, 14 και 21 της γαλουχίας. Τυχόν παρατηρούμενες φυσικές ανωμαλίες ή ανωμαλίες στη συμπεριφορά των μητέρων ή των γόνων τους, θα πρέπει να καταγράφονται.

▼B

Η φυσική ανάπτυξη των γόνων θα πρέπει να παρακολουθείται μέσω, κυρίως, της καταγραφής της αύξησης του σωματικού βάρους. Ορισμένες άλλες φυσικές παράμετροι (π.χ. το άνοιγμα των αυτιών και των ματιών, η έκφυση των δοντιών, η αύξηση του τριχώματος) μπορούν να δώσουν συμπληρωματικές πληροφορίες, τα στοιχεία όμως αυτά θα πρέπει, κατά προτίμηση, να αξιολογούνται στα πλαίσια στοιχείων για τη σεξουαλική ωρίμανση (π.χ. ηλικία και σωματικό βάρος στο κολπικό άνοιγμα ή στο βαλανοποσθικό διαχωρισμό) (13). Εάν δεν προβλέπεται η διενέργεια λειτουργικών ερευνών (π.χ. κινητικότητα, αισθητήριος λειτουργία, οντογονία ανακλαστικών) σε ξεχωριστές μελέτες, συνιστάται η διενέργεια τέτοιων ερευνών στους γόνους F1 πριν και/ή μετά τον απογαλακτισμό, ιδιαίτερα για λειτουργίες που αφορούν τη σεξουαλική ωρίμανση. Στα απογαλακτισμένα άτομα F1 που επιλέγονται για ζευγάρωμα θα πρέπει να προσδιορίζεται η ηλικία του κολπικού ανοίγματος και του ποσθικού διαχωρισμού. Την ημέρα 0 μετά τη γέννηση στα νεογνά F2 θα πρέπει να μετριέται η πρωκτογεννητική απόσταση, εάν επηρεάζεται από διαφοροποιήσεις στη αναλογία φύλων ή το χρόνο σεξουαλικής ωρίμανσης των ατόμων F1.

Οι παρατηρήσεις σχετικά με τις λειτουργίες μπορούν να παραλείπονται σε ομάδες οι οποίες, ούτως ή άλλως, εμφανίζουν σαφή δείγματα δυσμενών αποτελεσμάτων (π.χ., ομάδες που κερδίζουν βάρος με σημαντική καθυστέρηση, κ.λπ.). Εάν πραγματοποιηθούν λειτουργικές έρευνες, αυτές δεν θα πρέπει να γίνονται σε νεογνά που έχουν επιλεγεί για ζευγάρωμα.

1.5.6 **Μακροσκοπική νεκροψία**

Με τον τερματισμό ή σε περίπτωση θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, όλα τα γονικά ζώα (P και F1), όλα τα νεογνά με εξωτερικές ανωμαλίες ή κλινικά σημεία, καθώς επίσης και ένα τυχαίως επιλεγόμενο νεογνό/φύλο/γέννα και από τις δύο γενεές F1 και F2, πρέπει να εξετάζονται μακροσκοπικώς για τυχόν ανατομικές ανωμαλίες ή παθολογικές διαφορές. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα νεογνά που θανατώνονται ανθρωπιστικά επειδή είναι ετοιμοθάνατα και τα νεκρά νεογνά, όταν δεν βραχούν, θα πρέπει να εξετάζονται για πιθανά ελαττώματα και/ή την αιτία θανάτου και να συντηρούνται.

Οι μήτρες όλων των πρωτοτόκων θηλυκών θα πρέπει να εξετάζονται, κατά τρόπο που να μη διακυβεύεται η ιστοπαθολογική αξιολόγηση, ως προς την ύπαρξη και τον αριθμό εμφυτεύσεων.

1.5.7 **Βάρη οργάνων**

Κατά το πέρας της μελέτης, θα πρέπει να προσδιορίζονται το βάρος σώματος και το βάρος των ακόλουθων οργάνων όλων των P και F1 γονικών ζώων (τα όργανα που είναι σε ζεύγη θα πρέπει να ζυγίζονται ξεχωριστά):

— Μήτρα, ωοθήκες

— Όρχεις, επιδιδυμίδες (σύνολο και ουρά)

— Προστάτης

— Σπερματοδόχοι κύστεις με πηκτικούς αδένες και τα υγρά τους και τον προστάτη (ως μία μονάδα)

— Εγκέφαλος, συκώτι, νεφρά, σπλήνα, υπόφυση, θυρεοειδής αδένας και επινεφρίδια και γνωστά όργανα στόχοι.

Θα πρέπει να προσδιορίζονται τα τελικά βάρη σώματος των νεογνών F1 και F2 που επιλέγονται για νεκροψία ενώ, από το ένα τυχαίως επιλεγόμενο νεογνό/φύλο/γέννα (βλέπε τμήμα 1.5.6) πρέπει να ζυγίζονται τα ακόλουθα όργανα: εγκέφαλος, σπλήνα και θύμος αδένας.

▼B

Εφόσον είναι εφικτό, τα αποτελέσματα της μακροσκοπικής νεκροψίας και των βαρών των οργάνων θα πρέπει να αξιολογούνται στα πλαίσια παρατηρήσεων από άλλες μελέτες επανειλημμένων δόσεων.

1.5.8 **Ιστοπαθολογία**

1.5.8.1 *Γονικά ζώα*

Τα ακόλουθα όργανα και ιστοί γονικών (P και F1) ζώων, ή αντιπροσωπευτικά δείγματά τους, πρέπει να στερεώνονται και να φυλάσσονται σε κατάλληλο μέσο για ιστοπαθολογική εξέταση.

— Κόλπος, μήτρα με τράχηλο και ωοθήκες (διατηρούμενα σε κατάλληλο στερεωτικό)

— Ένας όρχις (διατηρούμενος σε υγρό Bouin ή παρόμοιο στερεωτικό), μια επιδιδυμίδα, σπερματοδόχοι κύστεις, προστάτης και πηκτικός αδένας

— Προηγουμένως ταυτοποιημένα όργανα στόχοι από όλα τα P και F1 ζώα, που επιλέγηκαν για ζευγάρωμα.

Θα πρέπει να εκτελείται πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση των διατηρουμένων οργάνων και ιστών που αναφέρονται παραπάνω για όλα τα ζώα, μάρτυρες και ομάδας υψηλής δόσης, P και F1 που επελέγησαν για ζευγάρωμα. Η εξέταση των ωοθηκών των ζώων P είναι προαιρετική. Όργανα που εμφανίζουν αλλοιώσεις σχετιζόμενες με την αγωγή θα πρέπει να εξετάζονται και στις ομάδες χαμηλής και μεσαίας δόσης για να υποβοηθείται η εύρεση του NOAEL. Επιπλέον, αναπαραγωγικά όργανα των ζώων των ομάδων χαμηλής και μεσαίας δόσης, για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες μειωμένης γονιμότητας, π.χ., εκείνα τα οποία απέτυχαν να ζευγαρώσουν, να συλλάβουν, να γεννήσουν ή να παράσχουν υγιείς απογόνους, ή στα οποία επηρεάστηκε ο κύκλος του οίστρου ή ο αριθμός, η κινητικότητα ή η μορφολογία των σπερματοζωαρίων, θα πρέπει να υποβάλλονται σε ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Πρέπει να εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις όπως ατροφία ή όγκοι.

Θα πρέπει να πραγματοποιείται λεπτομερής ιστοπαθολογική εξέταση των όρχεων (π.χ. χρησιμοποιώντας στερεωτικό Bouin, ενσωμάτωση σε παραφίνη και εγκάρσιες τομές πάχους 4-5μm) για τον εντοπισμό επιδράσεων σχετιζόμενων με την αγωγή όπως κατακρατούμενες σπερματίδες, ελλείπουσες στιβάδες ή τύποι γεννητικών κυττάρων, πολυπυρηνικά γιγαντοκύτταρα ή εσχάρωση σπερμογενών κυττάρων στον αυλό (14). Στην εξέταση της άθικτης επιδιδυμίδος θα πρέπει να περιλαμβάνεται η κεφαλή, το σώμα και η ουρά, εξέταση η οποία μπορεί να συμπληρώνεται με αξιολόγηση μιας διαμήκους τομής. Η επιδιδυμίδα θα πρέπει να εξετάζεται ως προς τη διείσδυση λευκοκυττάρων, τυχόν μεταβολές ως προς τους επικρατούντες κυτταρικούς τύπους, διαμαρτούντες τύπους κυττάρων και φαγοκυττάρωση των σπερματοζωαρίων. Για την εξέταση των αρσενικών αναπαραγωγικών οργάνων μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι μέθοδοι PAS και χρώσης αιματοξυλίνης.

Η μετά την γαλουχία ωοθήκη θα πρέπει να περιέχει αρχέγονα και αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, καθώς και τα μεγάλα ωχρά σωμάτια της γαλουχίας. Ιστοπαθολογική εξέταση θα πρέπει να ανιχνεύει ποιοτική μείωση του αρχέγονου πληθυσμού ωοθυλακίων. Στα θηλυκά F1 θα πρέπει να διεξάγεται ποσοτική αξιολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων. Ο αριθμός των ζώων, η επιλογή ωοθηκικής τομής και το μέγεθος του δείγματος τομής θα πρέπει να είναι στατιστικώς κατάλληλα για τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία αξιολόγησης. Στην εξέταση θα πρέπει να περιλαμβάνεται καταμέτρηση του αριθμού των αρχέγονων ωοθυλακίων, στα οποία μπορούν να προστίθενται τα μικρά αναπτυσσόμενα θυλάκια, για σύγκριση των ωοθηκών ζώων αγωγής και μαρτυρίας (15)(16)(17)(18)(19).

▼B

1.5.8.2 *Απογαλακτιζόμενα ζώα*

Μακροσκοπικώς μη φυσιολογικός ιστός και όργανα στόχοι από όλα τα νεογνά με εξωτερικές ανωμαλίες ή κλινικά σημεία, καθώς και από το ένα τυχαίως επιλεγμένο νεογνό/φύλο/γέννα από αμφότερες τις γενεές F1 και F2 που έχουν επιλεγεί για ζευγάρωμα, πρέπει να στερεώνονται και να φυλάσσονται σε κατάλληλο μέσο για ιστοπαθολογική εξέταση. Θα πρέπει να διεξάγεται πλήρης ιστοπαθολογικός χαρακτηρισμός του διατηρημένου ιστού με ιδιαίτερη έμφαση στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος.

2 **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα δεδομένα θα αναφέρονται κατ' άτομο και θα συνοψίζονται σε μορφή πινάκων, εμφαίνοντας για κάθε ομάδα δοκιμής και για κάθε γενεά τον αριθμό των ζώων στην αρχή της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για ανθρωπιστικούς λόγους, τη χρονική στιγμή κάθε θανάτου ή ανθρωπιστικής θανάτωσης, τον αριθμό των γόνιμων ζώων, τον αριθμό των εγγύων θηλυκών, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, μια περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της χρονικής στιγμής εμφάνισης, της διάρκειας και της σοβαρότητας κάθε τοξικού αποτελέσματος, τους τύπους των παρατηρήσεων στα γονικά άτομα και στους απογόνους, τους τύπους των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και κάθε σχετικό στοιχείο για τις γέννες.

Τα αριθμητικά αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη, γενικώς αποδεκτή, στατιστική μέθοδο. Οι στατιστικές μέθοδοι θα πρέπει να επιλέγονται ως τμήμα του σχεδιασμού της μελέτης και θα πρέπει να αιτιολογούνται. Για ανάλυση των στοιχείων μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμα στατιστικά μοντέλα δόσης-απόκρισης. Η έκθεση θα πρέπει να περιλαμβάνει επαρκείς πληροφορίες για τη μέθοδο ανάλυσης και το χρησιμοποιηθέν πρόγραμμα στον υπολογιστή, έτσι ώστε ένας ανεξάρτητος αναθεωρητής/στατιστικολόγος να μπορεί να επαναξιολογήσει και να ανασκευάσει την ανάλυση

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα ευρήματα αυτής της μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή δύο γενεών θα πρέπει να αξιολογούνται όσον αφορά τις παρατηρούμενες επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων των ευρημάτων της νεκροψίας και της μικροσκοπικής εξέτασης. Στην αξιολόγηση περιλαμβάνεται η σχέση, ή η ανυπαρξία σχέσης, μεταξύ της δόσης της υπό δοκιμή ουσίας και της παρουσίας ή απουσίας, της συχνότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων των μακροσκοπικών αλλοιώσεων, ταυτοποιημένων οργάνων στόχων, επιδράσεων στη γονιμότητα, κλινικών μη φυσιολογικών συμπτωμάτων, επιδράσεων στις επιδόσεις στην αναπαραγωγή και στις γέννες, διαφορών στα σωματικά βάρη, επιδράσεων στη θνησιμότητα και κάθε άλλου τοξικού φαινομένου. Κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας και, όταν υπάρχουν διαθέσιμα, δεδομένα τοξικοκινητικής.

Μια σωστά διεξαχθείσα δοκιμή τοξικότητας στην αναπαραγωγή θα πρέπει να προσφέρει μια ικανοποιητική εκτίμηση του επιπέδου μη επίδρασης και κατανόηση των δυσμενών επιδράσεων στην αναπαραγωγή, στον τοκετό, στη γαλουχία και στη μεταγεννητική ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης και της σεξουαλικής ανάπτυξης.

▼B

2.3 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή δύο γενεών παρέχει πληροφορίες για τις επιπτώσης της επανειλημμένης έκθεσης σε μια ουσία κατά τη διάρκεια όλων των φάσεων του αναπαραγωγικού κύκλου. Ειδικότερα, η μελέτη παρέχει πληροφορίες για τις παραμέτρους της αναπαραγωγής και για την ανάπτυξη, αύξηση, ωρίμανση και επιβίωση των γόνων. Τα αποτέλεσματα της μελέτης θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με τα ευρήματα μελετών υποχρόνιας τοξικότητας, προγεννητικής τοξικότητας στην ανάπτυξη και τοξικοκινητικής, καθώς και άλλων διαθέσιμων μελετών. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εκτίμηση της ανάγκης διεξαγωγής περαιτέρω δοκιμών για μια χημική ουσία. Η παρέκταση των αποτελεσμάτων της μελέτης στον άνθρωπο ισχύει σε περιορισμένο βαθμό. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται άριστα ως πληροφορίες σχετικά με τα επίπεδα μη επίδρασης και την επιτρεπτή έκθεση του ανθρώπου (20)(21)(22)(23).

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία:

— φυσική εμφάνιση και, όπου είναι σκόπιμο, φυσικοχημικές ιδιότητες

— στοιχεία ταυτοποίησης

— καθαρότητα

Φορέας (αν χρησιμοποιείται):

— αιτιολόγηση επιλογής του συγκεκριμένου φορέα, αν είναι άλλος από νερό.

Υπό δοκιμή ζώα:

— χρησιμοποιούμενο είδος/φυλή

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, διαιτολόγιο, υλικά δημιουργίας φωλιάς, κ.λπ.

— επιμέρους βάρη των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής

Συνθήκες δοκιμής:

— λογική αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσεων,

— λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της υπό δοκιμή ουσίας/τροφής, επιτυγχανόμενη συγκέντρωση, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,

— αναγωγή από τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή/πόσιμο νερό (ppm) στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον γίνεται,

— λεπτομέρειες ποιότητας τροφής και νερού.

▼B

Αποτελέσματα:

— κατανάλωση τροφής, και κατανάλωση νερού εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία, αποτελεσματικότητα διατροφής (αύξηση σωματικού βάρους ανά γραμμάριο καταναλισκόμενης τροφής) και κατανάλωση ουσίας δοκιμής από ζώα P και F1, εκτός της περιόδου συνοίκησης και του τελευταίου τρίτου τουλάχιστον της γαλουχίας,

— δεδομένα απορρόφησης (εάν υπάρχουν διαθέσιμα),

— δεδομένα σωματικού βάρους για ζώα P και F1, που επιλέγονται για ζευγάρωμα

— στοιχεία βάρους γέννας και νεογνών,

— σωματικό βάρος κατά τη θυσία και δεδομένα απόλυτου και σχετικού βάρους οργάνων για τα γονικά ζώα,

— είδος, σοβαρότητα και διάρκεια κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων ή μη),

— χρονική στιγμή θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή αν τα ζώα επέζησαν μέχρι τέλους,

— δεδομένα τοξικής απόκρισης κατά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένων δεικτών ζευγαρώματος, γονιμότητας, κυήσεως, γέννησης, βιωσιμότητας και γαλουχίας στην έκθεση θα πρέπει να αναφέρονται οι αριθμοί που χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό αυτών των δεικτών,

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, στους γόνους, στη μεταγεννητική αύξηση, κ.λπ.,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερής περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— αριθμός P και F1 ζώων με κανονικό κύκλο και μήκος του κύκλου,

— συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ουράς επιδιδυμίδος, ποσοστό προοδευτικώς αυθορμήτως κινουμένων σπερματοζωαρίων, ποσοστό μορφολογικώς φυσιολογικών σπερματοζωαρίων και ποσοστό σπερματοζωαρίων με κάθε ταυτοποιούμενη ανωμαλία,

— χρόνος για ζευγάρωμα, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των ημερών μέχρι το ζευγάρωμα,

— μήκος κυήσεως,

— αριθμός εμφυτεύσεων, ωχρά σωμάτια, μέγεθος γέννας,

— αριθμός γεννήσεων εν ζωή και μετά την εμφύτευση απώλειες,

— αριθμός νεογνών με μακροσκοπικώς ορατές ανωμαλίες εφόσον εντοπιστούν, θα πρέπει να αναφέρεται ο αριθμός των καχεκτικών νεογνών,

— δεδομένα για φυσικά επιπολής ορόσημα σε νεογνά και άλλα δεδομένα για τη μεταγεννητική ανάπτυξη αξιολογούμενα φυσικά επιπολής ορόσημα θα πρέπει να αιτιολογούνται,

— δεδομένα για λειτουργικές παρατηρήσεις σε νεογνά και ενήλικα, αναλόγως,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι σκόπιμο.

▼B

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα, συμπεριλαμβανομένων τιμών NOAEL για τις επιδράσεις στις μητέρες και στους απογόνους.

4 **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39 44

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237- 244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thom Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-26.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and CD. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

Β.36. **ΤΟΞΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την TG 417 (2010) του ΟΟΣΑ. Μελέτες που εξετάζουν την τοξικοκινητική (ΤΚ) μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας διεξάγονται για τη λήψη κατάλληλων πληροφοριών σχετικά με την απορρόφηση, την κατανομή, τον βιομετασχηματισμό (ήτοι, τον μεταβολισμό) και την απέκκρισή της, για την υποστήριξη του συσχετισμού της συγκέντρωσης ή δόσης με την παρατηρούμενη τοξικότητα, καθώς και την κατανόηση του μηχανισμού τοξικότητάς της. Η ΤΚ βοηθά στην κατανόηση των τοξικολογικών μελετών καταδεικνύοντας ότι τα πειραματόζωα εκτίθενται συστημικά στην ελεγχόμενη χημική ουσία και αποκαλύπτοντας ποια είναι τα κυκλοφορούντα τμήματα (μητρική χημική ένωση/μεταβολίτες). Οι βασικές τοξικοκινητικές παράμετροι που προσδιορίζονται μέσω των μελετών αυτών παρέχουν επίσης πληροφορίες για το δυναμικό συσσώρευσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε ιστούς και/ή όργανα και το δυναμικό επαγωγής του βιομετασχηματισμού ως αποτέλεσμα της έκθεσης στην ελεγχόμενη χημική ουσία.

2. Τα τοξικοκινητικά δεδομένα μπορούν να συμβάλουν στην αξιολόγηση της επάρκειας και της σημασίας δεδομένων τοξικότητας στα ζώα, με σκοπό την παρέκταση για την εκτίμηση των κινδύνων για τον άνθρωπο. Επιπροσθέτως, οι τοξικοκινητικές μελέτες ενδέχεται να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τον προσδιορισμό επιπέδων δόσεων για μελέτες τοξικότητας (γραμμική έναντι μη γραμμικής κινητικής), για επιδράσεις στις οδούς χορήγησης, για τη βιοδιαθεσιμότητα και για ζητήματα σχετικά με τον σχεδιασμό της μελέτης. Ορισμένοι τύποι τοξικοκινητικών δεδομένων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη φυσιολογικά βασισμένων μοντέλων τοξικοκινητικής.

3. Τα δεδομένα για τους μεταβολίτες/την τοξικοκινητική έχουν σημαντικές χρήσεις, όπως είναι η υπόδειξη πιθανής τοξικότητας και τρόπων δράσης και της σχέσης τους με το επίπεδο δόσης και την οδό έκθεσης. Επιπροσθέτως, τα δεδομένα μεταβολισμού μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την αξιολόγηση της τοξικολογικής σημασίας που έχουν οι εκθέσεις σε εξωγενώς παραγόμενους μεταβολίτες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

4. Κατάλληλα τοξικοκινητικά δεδομένα μπορούν να υποστηρίξουν την περαιτέρω δυνατότητα αποδοχής και εφαρμογής ποσοτικών σχέσεων δομής-δραστηριότητας, συγκριτικών ή ομαδοποιημένων προσεγγίσεων για την αξιολόγηση της ασφάλειας χημικών ουσιών. Τα δεδομένα κινητικής ενδέχεται να είναι επίσης χρήσιμα για την αξιολόγηση της τοξικολογικής σημασίας άλλων μελετών (π.χ. in vivo/in vitro).

5. Εάν δεν αναφέρεται άλλη οδός χορήγησης (βλέπε ιδίως παραγράφους 74-78), η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το στόμα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

6. Τα κανονιστικά συστήματα έχουν διαφορετικές απαιτήσεις και ανάγκες σχετικά με τη μέτρηση καταληκτικών σημείων και παραμέτρων σχετικών με την τοξικοκινητική για τις διάφορες κατηγορίες χημικών ουσιών (π.χ. ζιζανιοκτόνα, βιοκτόνα, βιομηχανικά χημικά). Σε αντίθεση με τις περισσότερες μεθόδους δοκιμών, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιγράφει τον έλεγχο της τοξικοκινητικής, ο οποίος περιλαμβάνει πολλαπλές μετρήσεις και καταληκτικά σημεία. Στο μέλλον ενδέχεται να αναπτυχθούν αρκετές νέες μέθοδοι δοκιμών και/ή έγγραφα καθοδήγησης για την περιγραφή κάθε καταληκτικού σημείου χωριστά και με περισσότερες λεπτομέρειες. Στην περίπτωση της παρούσας μεθόδου δοκιμών, οι διεξαγόμενες δοκιμές ή αξιολογήσεις καθορίζονται από τις απαιτήσεις και/ή τις ανάγκες κάθε κανονιστικού συστήματος.

▼M4

7. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που μπορούν να διεξαχθούν για την αξιολόγηση της τοξικοκινητικής συμπεριφοράς μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας για κανονιστικούς σκοπούς. Ωστόσο, ανάλογα με τις συγκεκριμένες κανονιστικές ανάγκες ή καταστάσεις, ενδέχεται να μην είναι απαραίτητες όλες αυτές οι πιθανές μελέτες για την αξιολόγηση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Απαιτείται ευελιξία στον σχεδιασμό μελετών τοξικοκινητικής, λαμβάνοντας υπόψη τα χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που διερευνάται. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται διερεύνηση μόνο ενός συγκεκριμένου συνόλου ερωτημάτων για την αντιμετώπιση ζητημάτων κινδύνου που συνδέονται με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Επίσης, σε κάποιες περιπτώσεις, είναι δυνατόν να συλλεγούν τοξικοκινητικά δεδομένα στο πλαίσιο της αξιολόγησης άλλων τοξικολογικών μελετών. Σε άλλες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτούνται πρόσθετες και/ή περισσότερο εκτεταμένες μελέτες τοξικοκινητικής, ανάλογα με τις κανονιστικές ανάγκες και/ή εάν ανακύπτουν νέα ερωτήματα στο πλαίσιο της αξιολόγησης μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

8. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη από το πειραματικό εργαστήριο όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία και τους σχετικούς μεταβολίτες και ανάλογα πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης ώστε να βελτιώνεται η ποιότητα της μελέτης και να αποφεύγεται η περιττή χρήση των ζώων. Οι πληροφορίες αυτές θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν δεδομένα από άλλες σχετικές μεθόδους δοκιμών (μελέτες in vivo, μελέτες in vitro και/ή αξιολογήσεις in silico). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως ο συντελεστής κατανομής σε μείγμα οκτανόλης και νερού (εκφραζόμενος ως λογάριθμος P_{OW}), η σταθερά pKa, η υδατοδιαλυτότητα, η τάση ατμών και το μοριακό βάρος μιας χημικής ουσίας, ενδέχεται να είναι χρήσιμες για τον σχεδιασμό της μελέτης και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Μπορούν να προσδιοριστούν με κατάλληλες μεθόδους, που περιγράφονται στις σχετικές μεθόδους δοκιμών.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

9. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν έχει σχεδιαστεί για την αντιμετώπιση ειδικών περιστάσεων, όπως ζώων που βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης ή θηλασμού και των απογόνων τους, ή για την αξιολόγηση ενδεχόμενων καταλοίπων σε εκτεθειμένα ζώα που παράγουν τροφή. Ωστόσο, τα δεδομένα που λαμβάνονται από μελέτη προβλεπόμενη στο κεφάλαιο B.36 παρέχουν γενικές πληροφορίες που καθοδηγούν τον σχεδιασμό συγκεκριμένων μελετών για τις έρευνες αυτές. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν έχει σχεδιαστεί για τον έλεγχο νανοϋλικών. Μια έκθεση σχετικά με την προκαταρκτική αναθεώρηση των κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών του ΟΟΣΑ σχετικά με τη δυνατότητα εφαρμογής τους σε νανοϋλικά καταδεικνύει ότι η TG 417 (ισοδύναμη της παρούσας μεθόδου δοκιμών B.36) δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε νανοϋλικά (1).

ΟΡΙΣΜΟΙ

10. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο προσάρτημα.

ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΚΑΛΗΣ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΖΩΩΝ

11. Κατευθύνσεις για τη μη βάναυση μεταχείριση των ζώων περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ (2). Συνιστάται να λαμβάνεται υπόψη το έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ σε όλες τις μελέτες in vivo και in vitro που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Πιλοτικές μελέτες

12. Η χρήση πιλοτικών μελετών συνιστάται και ενθαρρύνεται για την επιλογή πειραματικών παραμέτρων για τις μελέτες τοξικοκινητικής (π.χ. μεταβολισμού, ισοζυγίου μάζας, αναλυτικών διαδικασιών, εύρεσης του πεδίου τιμών δόσης, αποβολής CO_2 κ.λπ. Για τον χαρακτηρισμό ορισμένων από τις παραμέτρους αυτές ενδέχεται να μην απαιτείται η χρήση ραδιοσημασμένων χημικών ουσιών.

▼M4

Επιλογή των ζώων

Είδος

13. Το είδος (και η φυλή) των ζώων που χρησιμοποιούνται σε δοκιμές τοξικοκινητικής θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι το ίδιο με το είδος που χρησιμοποιείται σε άλλες τοξικολογικές μελέτες εκτελούμενες με τη συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία. Συνήθως, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επίμυες, καθώς αυτοί έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στις τοξικολογικές μελέτες. Η χρήση άλλων ή πρόσθετων ειδών μπορεί να δικαιολογείται, εάν κρίσιμες τοξικολογικές μελέτες καταδεικνύουν στοιχεία σημαντικής τοξικότητας στα είδη αυτά ή εάν η τοξικότητα/τοξικοκινητική σε αυτά τα είδη φαίνεται να έχει μεγαλύτερη σημασία για τον άνθρωπο. Θα πρέπει να αιτιολογείται το είδος των ζώων που έχουν επιλεγεί και η φυλή τους.

14. Εκτός εάν αναφέρεται κάτι διαφορετικό, στην παρούσα μέθοδο δοκιμών ελεγχόμενο είδος θεωρείται ο επίμυς (αρουραίος). Ορισμένες πτυχές της μεθόδου ενδέχεται να πρέπει να τροποποιηθούν στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται άλλα είδη στη δοκιμή.

Ηλικία και φυλή

15. Πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά, υγιή, ενήλικα ζώα (συνήθως ηλικίας 6-12 εβδομάδων κατά τον χρόνο χορήγησης των δόσεων) (βλέπε επίσης παραγράφους 13 και 14). Θα πρέπει να αιτιολογείται τυχόν χρήση ζώων που δεν είναι νεαρά ενήλικα ζώα. Όλα τα ζώα θα πρέπει να έχουν παρόμοια ηλικία κατά την έναρξη της μελέτης. Το εύρος διακύμανσης βαρών των ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους της ομάδας πειραματισμού. Σε ιδανικές συνθήκες, η χρησιμοποιούμενη φυλή θα πρέπει να είναι η ίδια με τη φυλή που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της τοξικολογικής βάσης δεδομένων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

Αριθμός και φύλο των ζώων

16. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ' ελάχιστον τέσσερα ζώα του ενός φύλου για κάθε ελεγχόμενη δόση. Αιτιολόγηση πρέπει να παρέχεται για το φύλο των χρησιμοποιούμενων ζώων. Θα πρέπει να εξετάζεται η χρήση και των δύο φύλων (τέσσερα αρσενικά και τέσσερα θηλυκά ζώα), εάν υπάρχουν στοιχεία που καταδεικνύουν σημαντικές διαφορές στην τοξικότητα οι οποίες συνδέονται με το φύλο.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

17. Τα ζώα πρέπει γενικά να στεγάζονται κατ' άτομο κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής. Η στέγαση σε ομάδες ενδέχεται να είναι δικαιολογημένη σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος να αποτελείται από δώδεκα ώρες φωτός και δώδεκα ώρες σκότους. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (± 3 °C) και η σχετική υγρασία να κυμαίνεται μεταξύ 30-70 %. Όσον αφορά τη διατροφή, μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με παροχή απεριόριστου πόσιμου νερού.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

18. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ελεγχόμενη χημική ουσία ραδιοσημασμένη με ^{14}C για όλες τις πτυχές της μελέτης που συνδέονται με το ισοζύγιο μάζας και τον προσδιορισμό των μεταβολιτών. Ωστόσο, εάν μπορεί να καταδειχθεί ότι:

— το ισοζύγιο μάζας και ο προσδιορισμός των μεταβολιτών μπορούν να εκτιμηθούν καταλλήλως με τη μη σημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία,

— η αναλυτική εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου που χρησιμοποιείται με τη μη ραδιενεργή ελεγχόμενη χημική ουσία ισούται ή είναι μεγαλύτερη αυτής που θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία,

▼M4

δεν χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία. Επιπροσθέτως, ενδέχεται να χρησιμοποιούνται άλλα ραδιενεργά ή σταθερά ισότοπα, ιδίως εάν το στοιχείο είναι υπεύθυνο για το τοξικό τμήμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή είναι μέρος αυτού. Εάν είναι δυνατό, η ραδιοσήμανση θα πρέπει να εντοπίζεται σε κεντρικό τμήμα του μορίου που είναι μεταβολικά σταθερό [δεν είναι ανταλλάξιμο, δεν απομακρύνεται μεταβολικά ως CO_2 και δεν καθίσταται μέρος του αποθέματος ενός ατόμου άνθρακα (one-carbon pool) του οργανισμού]. Η σήμανση πολλαπλών σημείων ή συγκεκριένων περιοχών του μορίου ενδέχεται να είναι απαραίτητη για την παρακολούθηση της μεταβολικής πορείας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

19. Η ραδιοσημασμένη και η μη ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να αναλύονται με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων ώστε να προσδιορίζεται η καθαρότητα και η ταυτότητά τους. Η ραδιοκαθαρότητα της ραδιενεργού ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει να είναι η υψηλότερη δυνατή για τη συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία (σε ιδανικές συνθήκες, θα πρέπει να είναι υψηλότερη του 95 %), ενώ θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για τον εντοπισμό τυχόν προσμείξεων που υπάρχουν σε ποσοστό 2 % ή υψηλότερο. Η καθαρότητα, καθώς και η ταυτότητα και η αναλογία τυχόν προσμείξεων που έχουν προσδιοριστεί, θα πρέπει να αναφέρονται. Τα επιμέρους κανονιστικά προγράμματα ενδέχεται να επιλέγουν να παρέχουν πρόσθετη καθοδήγηση για την υποστήριξη του ορισμού και των προδιαγραφών ελεγχόμενων χημικών ουσιών αποτελούμενων από μείγματα και των μεθόδων για τον προσδιορισμό της καθαρότητας.

Επιλογή των δόσεων

Πιλοτική μελέτη

20. Συνήθως μια μεμονωμένη δόση χορηγούμενη από το στόμα επαρκεί για την πιλοτική μελέτη. Η δόση θα πρέπει να είναι μη τοξική, αλλά αρκετά υψηλή ώστε να επιτρέπει τον προσδιορισμό μεταβολιτών στα απεκκρίματα (και στο πλάσμα, εάν ενδείκνυται), καθώς και να εκπληρώνει τον δηλωθέντα σκοπό της πιλοτικής μελέτης, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 12 της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Κυρίως μελέτες

21. Για τις κυρίως μελέτες, προτιμάται ελάχιστος αριθμός δύο δόσεων, καθώς οι πληροφορίες που συγκεντρώνονται από τουλάχιστον δύο ομάδες δόσεων μπορούν να βοηθήσουν στον καθορισμό των δόσεων σε άλλες μελέτες τοξικότητας και στην αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης σε δοκιμές τοξικότητας που είναι ήδη διαθέσιμες.

22. Στην περίπτωση χορήγησης δύο δόσεων, αμφότερες οι δόσεις θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλές ώστε να επιτρέπουν τον προσδιορισμό μεταβολιτών στα απεκκρίματα (και στο πλάσμα, εφόσον ενδείκνυται). Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των δόσεων τυχόν πληροφορίες από διαθέσιμα δεδομένα τοξικότητας. Εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες (π.χ. από μελέτες οξείας τοξικότητας μέσω της στοματικής οδού που καταγράφουν κλινικές εκδηλώσεις τοξικότητας ή από μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση), ενδέχεται να εξετάζεται η χρήση μια τιμής για την υψηλότερη δόση η οποία είναι κατώτερη της εκτίμησης της LD_{50} (έκθεση μέσω του στόματος και μέσω του δέρματος) ή της LC_{50} (αναπνευστική έκθεση) ή κατώτερη της χαμηλότερης τιμής της εκτίμησης του πεδίου τιμών οξείας τοξικότητας. Η χαμηλότερη δόση θα πρέπει να είναι κάποιο κλάσμα της υψηλότερης δόσης.

23. Εάν διερευνάται μόνο μία δόση, η δόση θα πρέπει, ιδανικά, να είναι αρκετά υψηλή ώστε να επιτρέπει τον προσδιορισμό μεταβολιτών στα απεκκρίματα (και στο πλάσμα, εάν ενδείκνυται) χωρίς να παράγει εμφανείς εκδηλώσεις τοξικότητας. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή μη χρήσης δεύτερου επιπέδου δόσης.

24. Εάν πρέπει να προσδιοριστεί η επίδραση της δόσης στις κινητικές διεργασίες, ενδέχεται να μην επαρκούν οι δύο δόσεις, ενώ τουλάχιστον μία δόση θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε να προκαλείται κορεσμός των διεργασιών αυτών. Εάν η περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης στο πλάσμα-χρόνου (AUC) δεν είναι γραμμική μεταξύ δύο επιπέδων δόσης χρησιμοποιούμενων στην κυρίως μελέτη, πιθανότατα πραγματοποιείται κορεσμός μιας ή περισσότερων κινητικών διεργασιών κάπου ανάμεσα στα δύο επίπεδα δόσης.

▼M4

25. Στην περίπτωση ελεγχόμενων χημικών ουσιών χαμηλής τοξικότητας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μέγιστη δόση 1 000 mg/kg βάρους σώματος (έκθεση μέσω του στόματος και μέσω του δέρματος) (για την έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού, βλέπε καθοδήγηση στο κεφάλαιο B.2 του παρόντος παραρτήματος· συνήθως, η δόση αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 2 mg/l). Λόγω ζητημάτων σχετικών με τη συγκεκριμένη χημική ουσία, ενδέχεται να απαιτείται υψηλότερη δόση ανάλογα με τις κανονιστικές ανάγκες. Θα πρέπει να αιτιολογείται πάντα η επιλογή των δόσεων.

26. Δεδομένα τοξικοκινητικής και ιστικής κατανομής μονής δόσης ενδέχεται να επαρκούν για τον προσδιορισμό του δυναμικού συσσώρευσης και/ή παραμονής. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται επαναλαμβανόμενη δόση i) για να αντιμετωπιστεί πληρέστερα το δυναμικό συσσώρευσης και/ή παραμονής ή μεταβολές στην τοξικοκινητική (ήτοι, παραδείγματος χάριν, ενζυμική επαγωγή και παρεμπόδιση) ή ii) λόγω απαιτήσεων του ισχύοντος κανονιστικού συστήματος. Σε μελέτες που περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενη δόση, παρόλο που συνήθως επαρκεί η επανειλημμένη χορήγηση μικρών δόσεων, ενδέχεται να απαιτείται υπό ορισμένες συνθήκες επανειλημμένη χορήγηση υψηλών δόσεων (βλέπε επίσης παράγραφο 57).

Χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

27. Η ελεγχόμενη χημική ουσία πρέπει να μετατρέπεται σε ομοιογενές διάλυμα ή εναιώρημα στον ίδιο φορέα που χρησιμοποιήθηκε για της άλλες μελέτες τοξικότητας με καθετήρα που εκτελέστηκαν με την ελεγχόμενη χημική ουσία, εάν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τον συγκεκριμένο φορέα. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή του φορέα. Η επιλογή φορέα και ο όγκος των δόσεων θα πρέπει να εξετάζονται κατά τον σχεδιασμό της μελέτης. Η συνήθης μέθοδος χορήγησης είναι χορήγηση με καθετήρα. Ωστόσο, η χορήγηση με ζελατινούχα κάψουλα ή με ανάμειξη στην τροφή ενδέχεται να έχει πλεονεκτήματα σε συγκεκριμένες περιπτώσεις (και στις δύο περιπτώσεις θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλεγμένη μέθοδος). Θα πρέπει να επαληθεύεται η πραγματική δόση που έχει χορηγηθεί σε κάθε ζώο.

28. Ο μέγιστος όγκος υγρού που πρέπει να χορηγείται μέσω καθετήρα κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος των πειραματόζωων, τον τύπο του φορέα των δόσεων και το εάν το ζώο στερείται τροφής πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή όχι. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή χορήγησης τροφής ή στέρησης τροφής πριν από τη χορήγηση των δόσεων. Συνήθως, ο όγκος θα πρέπει να διατηρείται σε όσο το δυνατόν χαμηλό επίπεδο, τόσο στην περίπτωση υδατικών φορέων όσο και στην περίπτωση μη υδατικών φορέων. Οι όγκοι δόσης δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν κανονικά τα 10 ml/kg βάρους σώματος στην περίπτωση των τρωκτικών. Οι όγκοι των φορέων που χρησιμοποιούνται για περισσότερο λιπόφιλες ελεγχόμενες χημικές ουσίες μπορούν να αρχίζουν από 4 ml/kg βάρος σώματος. Σε περίπτωση επαναλαμβανόμενης δόσης, όταν αντενδείκνυται η καθημερινή στέρηση τροφής, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερων όγκων δόσης (π.χ. 2-4 ml/kg βάρους σώματος). Εάν είναι δυνατό, θα πρέπει να μελετάται το ενδεχόμενο χρήσης όγκου δόσης αντίστοιχου του όγκου που δόσης που χορηγήθηκε σε άλλες μελέτες με καθετήρα για τη συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία.

29. Ενδοφλέβια χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και μέτρησή της στο αίμα και/ή τα απεκκρίματα ενδέχεται να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητας ή της σχετικής απορρόφησης μέσω του στόματος. Στην περίπτωση μελέτης με ενδοφλέβια χορήγηση, χορηγείται μία δόση (συνήθως ισοδύναμη της χαμηλότερης δόσης που χορηγείται από το στόμα, χωρίς ωστόσο να την υπερβαίνει —βλέπε επιλογή των δόσεων) με τη χρήση κατάλληλου φορέα. Το υλικό αυτό θα πρέπει να χορηγείται σε κατάλληλο όγκο (π.χ. 1 ml/kg βάρους σώματος) στο επιλεγμένο σημείο χορήγησης σε τουλάχιστον τέσσερα ζώα του κατάλληλου φύλου (εφόσον δικαιολογείται, ενδέχεται να χρησιμοποιούνται αμφότερα τα φύλα, βλέπε παράγραφο 16). Απαιτείται παρασκεύασμα δόσης σε μορφή πλήρους διαλύματος ή εναιωρήματος για την ενδοφλέβια χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Ο φορέας ενδοφλέβιας χορήγησης δεν θα πρέπει να επηρεάζει την ακεραιότητα ή τη ροή του αίματος. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με έγχυση, ο ρυθμός έγχυσης θα πρέπει να αναφέρεται και να είναι τυποποιημένος μεταξύ των ζώων, εφόσον χρησιμοποιείται αντλία έγχυσης. Θα πρέπει να εφαρμόζεται αναισθησία εάν διασωληνώνεται η σφαγίτιδα φλέβα (για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής

▼M4

ουσίας και/ή αιμοληψία) ή εάν χρησιμοποιείται η μηριαία αρτηρία για τη χορήγηση. Θα πρέπει να δίδεται δέουσα προσοχή στον τύπο αναισθησίας, καθώς ενδέχεται να προκαλέσει τοξικοκινητικές επιδράσεις. Θα πρέπει να δίδεται αρκετός χρόνος για την κατάλληλη ανάρρωση των ζώων πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και του φορέα.

30. Ενδέχεται να είναι κατάλληλες και άλλες οδοί χορήγησης, όπως χορήγηση μέσω του δέρματος ή της εισπνοής (βλέπε παραγράφους 74-78), για ορισμένες ελεγχόμενες χημικές ουσίες, λαμβάνοντας υπόψη τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και την αναμενόμενη χρήση ή έκθεση του ανθρώπου.

Μετρήσεις

Ισοζύγιο μάζας

31. Το ισοζύγιο μάζας προσδιορίζεται μέσω άθροισης του ποσοστού της χορηγούμενης (ραδιενεργού) δόσης που απεκκρίνεται στα ούρα, τα κόπρανα και τον εκπνεόμενο αέρα και του ποσοστού που υπάρχει στους ιστούς, το υπόλοιπο του πτώματος του ζώου και τα υγρά έκπλυσης του κλωβού (βλέπε παράγραφο 46). Γενικά, συνολική ανάκτηση της χορηγούμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργεια) μεγαλύτερη του 90 % θεωρείται ότι είναι επαρκής.

Απορρόφηση

32. Μπορεί να πραγματοποιηθεί αρχική εκτίμηση της απορρόφησης με την εξαίρεση του ποσοστού της δόσης στο γαστρεντερικό σύστημα και/ή τα κόπρανα από το προσδιορισθέν ισοζύγιο μάζας. Για τον υπολογισμό της ποσοστιαίας απορρόφησης, βλέπε παράγραφο 33. Για τη διερεύνηση των απεκκριμάτων, βλέπε παραγράφους 44-49. Εάν δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί επακριβώς ο βαθμός απορρόφησης κατόπιν χορήγησης δόσης από το στόμα μέσω μελετών ισοζυγίου μάζας (π.χ., όταν υπάρχει στα κόπρανα ποσοστό μεγαλύτερο του 20 % της χορηγούμενης δόσης), ενδέχεται να απαιτούνται περαιτέρω έρευνες. Οι μελέτες αυτές ενδεχομένως να περιλαμβάνουν είτε 1) χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το στόμα και μέτρησή της στη χολή ή 2) χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το στόμα και ενδοφλεβίως και μέτρηση της καθαρής ελεγχόμενης χημικής ουσίας στα ούρα, στον εκπνεόμενο αέρα και στο πτώμα του ζώου σε καθεμιά από τις δύο μεθόδους χορήγησης. Όπως και εάν έχει σχεδιαστεί η μελέτη, η μέτρηση της ραδιενέργειας εκτελείται ως υποκατάστατη μέθοδος για την ανάλυση της συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των σχετικών μεταβολιτών.

33. Εάν διεξάγεται μελέτη των χολικών απεκκριμάτων, χρησιμοποιείται συνήθως χορήγηση από το στόμα. Στη συγκεκριμένη μελέτη, θα πρέπει να διασωληνώνονται οι χοληδόχοι πόροι τουλάχιστον τεσσάρων ζώων του κατάλληλου φύλου (ή και των δύο φύλων, εάν δικαιολογείται) και να χορηγείται μία δόση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Μετά τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θα πρέπει να παρακολουθείται η απέκκριση ραδιενέργειας/ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη χολή για όσο διάστημα είναι απαραίτητο ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό της χορηγούμενης δόσης που απεκκρίνεται μέσω της οδού αυτής, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον απευθείας υπολογισμό του βαθμού απορρόφησης από το στόμα, ως εξής:

$$\text{Ποσοστιαία απορρόφηση} = \frac{(\text{ποσότητα σε χολή} + \text{ούρα} + \text{εκπνεόμενο αέρα} + \text{σφάγιο χωρίς τα περιεχόμενα του γαστρεντερικού συστήματος})}{\text{χορηγηθείσα ποσότητα}} \times 100$$

34. Σε ορισμένες κατηγορίες ελεγχόμενης χημικής ουσίας ενδέχεται να προκύψει άμεση απέκκριση της απορροφώμενης δόσης από τις εντερικές μεμβράνες. Στις περιπτώσεις αυτές, η μέτρηση της ποσοστιαίας δόσης στα κόπρανα κατόπιν χορήγησης δόσης από το στόμα σε επίμυ διασωληνωμένο στο χοληδόχο πόρο δεν θεωρείται αντιπροσωπευτική της μη απορροφώμενης δόσης. Συνιστάται, στην περίπτωση που θεωρείται πιθανόν να προκύψει απέκκριση στα έντερα, το ποσοστό της απορροφώμενης δόσης να βασίζεται στην απορρόφηση που υπολογίζεται μέσω σύγκρισης της απέκκρισης μετά τη χορήγηση δόσης από το στόμα έναντι της απέκκρισης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση (άθικτος ή διασωληνωμένος στο χοληδόχο πόρο επίμυς) (βλέπε παράγραφο 35). Συνιστάται επίσης, στην περίπτωση που θεωρείται απαραίτητος ο ποσοτικός προσδιορισμός της απέκκρισης στα έντερα, να μετράται η απέκκριση σε διασωληνωμένο στο χοληδόχο πόρο επίμυ μετά από χορήγηση ενδοφλέβιας δόσης.

▼M4

Βιοδιαθεσιμότητα

35. Η βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της κινητικής του πλάσματος/αίματος των ομάδων στις οποίες έχει χορηγηθεί δόση από το στόμα και ενδοφλεβίως, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 50-52, με συγκεκριμένη χημική ανάλυση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και/ή του σχετικού μεταβολίτη (των σχετικών μεταβολιτών), χωρίς να απαιτείται, επομένως, ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία. Ο υπολογισμός της βιοδιαθεσιμότητας (F) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή του σχετικού μεταβολίτη (των σχετικών μεταβολιτών) πραγματοποιείται ως εξής:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (\Delta\text{όση}_{IV}/\Delta\text{όση}_{exp})$$

όπου AUC είναι το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης στο πλάσμα-χρόνου, exp είναι η πειραματική οδός (μέσω του στόματος, του δέρματος ή της εισπνοής) και IV είναι η ενδοφλέβια χορήγηση.

36. Για την εκτίμηση των κινδύνων συστημικών επιδράσεων, η βιοδιαθεσιμότητα του τοξικού μέρους είναι γενικά προτιμότερη της ποσοστιαίας απορρόφησης όταν πραγματοποιείται σύγκριση των συστημικών συγκεντρώσεων που προκύπτουν από μελέτες σε ζώα με ανάλογα δεδομένα βιοπαρακολούθησης από μελέτες έκθεσης των εργαζομένων. Η κατάσταση μπορεί να περιπλακεί, εάν οι δόσεις βρίσκονται εντός μη γραμμικού πεδίου τιμών, οπότε είναι σημαντικό να καθοριστούν μέσω του τοξικοκινητικού ελέγχου δόσεις στο γραμμικό πεδίο τιμών.

Ιστική κατανομή

37. Η γνώση της ιστικής κατανομής μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας και/ή των μεταβολιτών της είναι σημαντική για τον προσδιορισμό των ιστών στόχου και την κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών τοξικότητας, καθώς και για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με το δυναμικό συσσώρευσης και παραμονής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των μεταβολιτών. Το ποσοστό της ολικής (ραδιενεργού) δόσης στους ιστούς, καθώς και στο υπόλοιπο σφάγιο θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον κατά τον τερματισμό του πειράματος απέκκρισης (π.χ. συνήθως 7 ημέρες μετά τη δόση ή λιγότερο, ανάλογα με τη συμπεριφορά της συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας). Στην περίπτωση που δεν εντοπίζεται η ελεγχόμενη χημική ουσία σε ιστούς κατά τον τερματισμό της μελέτης (π.χ. διότι η ελεγχόμενη χημική ουσία ενδέχεται να έχει εξαλειφθεί πριν από τον τερματισμό της μελέτης λόγω μικρού χρόνου υποδιπλασιασμού), θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην γίνεται παρερμηνεία των δεδομένων. Εάν προκύψει μια τέτοια κατάσταση, η ιστική κατανομή θα πρέπει να ερευνάται κατά τον χρόνο μέγιστης συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο πλάσμα/αίμα (T_{max}) ή κατά τον χρόνο του μέγιστου ποσοστού απέκκρισης στα ούρα, κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφο 38). Επιπροσθέτως, ενδέχεται να απαιτείται συλλογή ιστών και σε άλλες χρονικές στιγμές ώστε να προσδιορίζεται η ιστική κατανομή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και/ή των μεταβολιτών της, να αξιολογείται η εξάρτηση από τον χρόνο (κατά περίπτωση), να υποστηρίζεται ο προσδιορισμός του ισοζυγίου μάζας και/ή να πληρούνται οι απαιτήσεις των αρμόδιων αρχών. Στους ιστούς που θα πρέπει να συλλέγονται περιλαμβάνονται οι εξής: ήπαρ, λίπος, γαστρεντερικό σύστημα, νεφρός, σπλήνα, πλήρες αίμα, υπόλοιπο σφάγιο, ιστοί οργάνων στόχου και οποιοιδήποτε άλλοι ιστοί (π.χ. θυρεοειδής, ερυθρά αιμοσφαίρια, αναπαραγωγικά όργανα, δέρμα, οφθαλμοί [ιδίως σε ζώα που εμφανίζουν κηλίδες)] που είναι ενδεχομένως σημαντικοί για την τοξικολογική αξιολόγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης πρόσθετων ιστών κατά τις ίδιες χρονικές στιγμές ώστε να μεγιστοποιείται η χρήση των ζώων και στην περίπτωση που παρατηρείται τοξικότητα του οργάνου στόχου σε μελέτες υποχρόνιας ή χρόνιας τοξικότητας. Θα πρέπει να αναφέρονται επίσης η συγκέντρωση (ραδιενεργών) καταλοίπων και οι λόγοι ιστών-πλάσματος (αίματος).

38. Αξιολόγηση της ιστικής κατανομής σε πρόσθετες χρονικές στιγμές, όπως κατά τον χρόνο μέγιστης συγκέντρωσης πλάσματος/αίματος (π.χ. T_{max}) ή κατά τον χρόνο του μέγιστου ποσοστού απέκκρισης στα ούρα, που πραγματοποιείται μέσω αντίστοιχων πειραμάτων κινητικής πλάσματος/αίματος ή απέκκρισης, ενδέχεται να είναι επίσης απαραίτητη ή να απαιτείται από τις αρμόδιες αρχές. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να είναι χρήσιμες για την κατανόηση της τοξικότητας και του δυναμικού συσσώρευσης και παραμονής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των μεταβολιτών. Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή των δειγμάτων. Τα δείγματα ανάλυσης θα πρέπει γενικά να είναι τα ίδια με αυτά που αναφέρονται παραπάνω (βλέπε παράγραφο 37).

▼M4

39. Είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός της ραδιενέργειας σε μελέτες ιστικής κατανομής, με ανατομή οργάνων, ομοιογενοποίηση, καύση και/ή διαλυτοποίηση, συνοδευόμενη από μέτρηση των παγιδευμένων καταλοίπων με απαριθμητή σπινθηρισμού υγρών (LSC). Ορισμένες τεχνικές οι οποίες βρίσκονται σήμερα σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, π.χ. ποσοτική ολόσωμη αυτοραδιογραφία και μικροσκοπική αυτοραδιογραφία υποδοχέων, ενδέχεται να αποδειχθούν χρήσιμες για τον προσδιορισμό της κατανομής μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας στα όργανα και/ή τους ιστούς (3) (4).

40. Στην περίπτωση οδών έκθεσης εκτός της στοματικής οδού, θα πρέπει να συλλέγονται και να αναλύονται συγκεκριμένοι ιστοί, όπως οι πνεύμονες στις αναπνευστικές μελέτες και το δέρμα στις δερματικές μελέτες. Βλέπε παραγράφους 74-78.

Μεταβολισμός

41. Πρέπει να συλλέγονται απεκκρίματα (και πλάσμα, εάν ενδείκνυται) για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αμετάβλητης ελεγχόμενης χημικής ουσίας και μεταβολιτών, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 44-49. Η ομαδοποίηση απεκκριμάτων για τη διευκόλυνση της ταυτοποίησης μεταβολιτών σε μια δεδομένη ομάδα δόσης είναι αποδεκτή. Συνιστάται να καθορίζεται το προφίλ των μεταβολιτών κάθε χρονικής περιόδου. Ωστόσο, εάν αυτό δεν είναι δυνατό λόγω έλλειψης δειγμάτων και/ή ραδιενέργειας, είναι αποδεκτή η ομαδοποίηση ούρων και κοπράνων που έχουν ληφθεί σε διάφορες χρονικές στιγμές, αλλά δεν είναι αποδεκτή η ομαδοποίηση δειγμάτων από διαφορετικά φύλα ή δόσεις. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες ποιοτικές και ποσοτικές μέθοδοι για τον έλεγχο ούρων, κοπράνων, ραδιενέργειας στον αέρα που εκπνέουν τα ζώα που έχουν υποβληθεί στο πείραμα και χολής, εάν ενδείκνυται.

42. Θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για την ταυτοποίηση όλων των μεταβολιτών που υπάρχουν σε ποσοστό 5 % ή υψηλότερο της χορηγούμενης δόσης και για την παροχή ενός μεταβολικού συστήματος για την ελεγχόμενη χημική ουσία. Θα πρέπει να ταυτοποιούνται οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες που έχουν χαρακτηριστεί ότι βρίσκονται σε ποσοστό 5 % ή μεγαλύτερο της χορηγούμενης δόσης στα απεκκρίματα. Η ταυτοποίηση αφορά τον ακριβή δομικό προσδιορισμό των στοιχείων. Συνήθως, η ταυτοποίηση επιτυγχάνεται είτε μέσω συγχρωματογραφίας του μεταβολίτη με γνωστά πρότυπα με τη χρήση δύο διαφορετικών συστημάτων ή μέσω τεχνικών που επιτρέπουν θετική δομική ταυτοποίηση, όπως φασματομετρίας μάζας, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) κ.λπ. Στην περίπτωση συγχρωματογραφίας, οι τεχνικές χρωματογραφίας που χρησιμοποιούν την ίδια στατική φάση με δύο διαφορετικά συστήματα διαλύτη δεν θεωρείται ότι αποτελούν κατάλληλη επαλήθευση της ταυτότητας των μεταβολιτών μέσω δύο μεθόδων, καθώς οι μέθοδοι δεν είναι ανεξάρτητες. Η ταυτοποίηση με συγχρωματογραφία θα πρέπει να πραγματοποιείται με δύο διαφορετικά, ανεξάρτητα αναλυτικά συστήματα, όπως χρωματογραφία λεπτής στιβάδος αντίστροφης και κανονικής φάσης (TLC) και υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Εφόσον ο χρωματογραφικός διαχωρισμός είναι κατάλληλης ποιότητας, δεν είναι απαραίτητη η πρόσθετη επαλήθευση με φασματοσκοπικά μέσα. Εναλλακτικά, μπορεί να επιτευχθεί σαφής ταυτοποίηση με τη χρήση μεθόδων που παρέχουν πληροφορίες για τη δομή, όπως οι εξής: υγροχρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (LC-MS) ή υγροχρωματογραφία/δίδυμη φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS), αεριοχρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (GC-MS) και φασματομετρία NMR.

43. Εάν δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση μεταβολιτών σε ποσοστό 5 % ή μεγαλύτερο της χορηγούμενης δόσης, πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση/επεξήγηση στην τελική έκθεση. Ενδέχεται να ενδείκνυται η ταυτοποίηση μεταβολιτών που αντιστοιχούν σε ποσοστό μικρότερο του 5 % της χορηγούμενης δόσης ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη κατανόηση της μεταβολικής οδού για την εκτίμηση των κινδύνων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει να αναφέρεται η επαλήθευση της δομής. Η διαδικασία αυτή μπορεί να περιλαμβάνει προσδιορισμό των χαρακτηριστικών στο πλάσμα ή το αίμα ή σε άλλους ιστούς.

▼M4

Απέκκριση

44. Ο ρυθμός και ο βαθμός απέκκρισης της χορηγούμενης δόσης θα πρέπει να προσδιορίζεται μετρώντας το ποσοστό της (ραδιενεργού) δόσης που ανακτάται από τα ούρα, τα κόπρανα και τον εκπνεόμενο αέρα. Τα δεδομένα αυτά βοηθούν επίσης στον προσδιορισμό του ισοζυγίου μάζας. Οι ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργειας) που αποικοδομείται στα ούρα, τα κόπρανα και τον εκπνεόμενο αέρα θα πρέπει να προσδιορίζονται ανά κατάλληλα διαστήματα (βλέπε παραγράφους 47-49). Τα πειράματα επαναλαμβανόμενης δόσης πρέπει να σχεδιάζονται κατάλληλα ώστε να επιτρέπουν τη συλλογή δεδομένων απέκκρισης για την εκπλήρωση των στόχων που περιγράφονται στην παράγραφο 26. Με τον τρόπο αυτόν, είναι δυνατή η σύγκριση με πειράματα μονής δόσης.

45. Εάν έχει καταδειχθεί σε πιλοτική μελέτη ότι δεν απεκκρίνεται σημαντική ποσότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργειας) (σύμφωνα με την παράγραφο 49) στον εκπνεόμενο αέρα, τότε δεν χρειάζεται να συλλεχθεί ο εκπνεόμενος αέρας στην οριστική μελέτη.

46. Κάθε ζώο πρέπει να τοποθετείται σε χωριστή μεταβολική μονάδα για τη συλλογή απεκκριμάτων (στα ούρα, τα κόπρανα και τον εκπνεόμενο αέρα). Στο τέλος κάθε περιόδου συλλογής (βλέπε παραγράφους 47-49), οι μεταβολικές μονάδες θα πρέπει να διαβρέχονται με κατάλληλο διαλύτη (διαδικασία γνωστή ως «έκπλυση των κλωβών») ώστε να εξασφαλίζεται η μέγιστη ανάκτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργειας). Η συλλογή των απεκκριμάτων θα πρέπει να τερματίζεται την 7η ημέρα ή αφού έχει ανακτηθεί τουλάχιστον το 90 % της χορηγούμενης δόσης, ανάλογα με το ποιο από τα δύο λαμβάνει χώρα πρώτο.

47. Οι συνολικές ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργειας) στα ούρα πρέπει να προσδιορίζονται τουλάχιστον δύο χρονικές στιγμές την 1η ημέρα συλλογής, μία εκ των οποίων θα πρέπει να είναι 24 ώρες μετά τη χορήγηση της δόσης, και καθημερινά στη συνέχεια, έως τον τερματισμό της μελέτης. Ενθαρρύνεται η επιλογή περισσότερων από δύο χρονικών στιγμών δειγματοληψίας την 1η ημέρα (π.χ. την 6η, τη 12η και την 24η ώρα). Τα αποτελέσματα πιλοτικών μελετών θα πρέπει να αναλύονται για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με εναλλακτικές ή πρόσθετες χρονικές στιγμές συλλογής. Το χρονοδιάγραμμα συλλογής θα πρέπει να αιτιολογείται.

48. Οι συνολικές ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ραδιενέργειας) στα κόπρανα πρέπει να προσδιορίζονται καθημερινά, ξεκινώντας 24 ώρες μετά τη χορήγηση της δόσης, έως τον τερματισμό της μελέτης, εκτός εάν εναλλακτικές ή πρόσθετες στιγμές συλλογής καταδεικνύονται από πιλοτικές μελέτες. Τυχόν εφαρμογή εναλλακτικών χρονοδιαγραμμάτων συλλογής θα πρέπει να αιτιολογείται.

49. Η συλλογή εκπνεόμενου CO_2 και άλλων πτητικών υλικών ενδέχεται να διακόπτεται σε μια δεδομένη πειραματική μελέτη στην περίπτωση που εντοπίζεται ποσοστό μικρότερο του 1 % της χορηγούμενης δόσης στον εκπνεόμενο αέρα κατά τη διάρκεια μιας περιόδου συλλογής 24 ωρών.

Μελέτες χρονικής πορείας

Κινητική πλάσματος/αίματος

50. Σκοπός των μελετών αυτών είναι η λήψη εκτιμήσεων των βασικών τοξικοκινητικών παραμέτρων [π.χ. C_{max}, T_{max}, χρόνος υποδιπλασιασμού ($t_{1/2}$), AUC] της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Οι μελέτες αυτές μπορούν να διεξάγονται με μία δόση ή, πιθανότερα, με δύο ή περισσότερες δόσεις. Ο καθορισμός των δόσεων θα πρέπει να προσδιορίζεται βάσει της φύσης του πειράματος και/ή του θέματος που αντιμετωπίζεται. Ενδέχεται να απαιτούνται κινητικά δεδομένα για την επίλυση ζητημάτων όπως η βιοδιαθεσιμότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και/ή για τη διασαφήνιση της επίδρασης της δόσης στην κάθαρση (π.χ. για να διασαφηνιστεί εάν η κάθαρση έχει κορεστεί κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση).

51. Στις μελέτες αυτές θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα του ενός φύλου ανά ομάδα δόσης. Αιτιολόγηση πρέπει να παρέχεται για το φύλο των χρησιμοποιούμενων ζώων. Θα πρέπει να εξετάζεται η χρήση και των δύο φύλων (τέσσερα αρσενικά και τέσσερα θηλυκά ζώα), εάν υπάρχουν στοιχεία που καταδεικνύουν σημαντικές διαφορές στην τοξικότητα οι οποίες συνδέονται με το φύλο.

▼M4

52. Μετά τη χορήγηση της ελεγχόμενης (ραδιοσημασμένης) χημικής ουσίας, λαμβάνονται δείγματα αίματος από κάθε ζώο σε κατάλληλες χρονικές στιγμές με τη χρήση κατάλληλης μεθοδολογίας δειγματοληψίας. Ο όγκος και ο αριθμός των δειγμάτων αίματος που μπορούν να ληφθούν ανά ζώο ενδέχεται να περιορίζονται από τις ενδεχόμενες επιδράσεις της επανειλημμένης δειγματοληψίας στην υγεία/φυσιολογία του ζώου και/ή στην ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου. Τα δείγματα αναλύονται χωριστά για κάθε ζώο. Σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. χαρακτηρισμός μεταβολιτών), ενδέχεται να είναι απαραίτητη η ομαδοποίηση δειγμάτων από περισσότερα του ενός ζώα. Τα ομαδοποιημένα δείγματα πρέπει να ταυτοποιούνται με σαφήνεια, ενώ η ομαδοποίηση πρέπει να αιτιολογείται. Εάν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία, ενδέχεται να επαρκεί η ανάλυση της ολικής ραδιενέργειας που υπάρχει. Στην περίπτωση αυτή, η ολική ραδιενέργεια πρέπει να αναλύεται στο πλήρες αίμα και στο πλάσμα ή στο πλάσμα και στα ερυθρά αιμοσφαίρια ώστε να υπολογίζεται ο λόγος αίματος/πλάσματος. Σε άλλες περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι απαραίτητες πιο συγκεκριμένες έρευνες που απαιτούν την ταυτοποίηση της μητρικής ένωσης και/ή των μεταβολιτών ή για την αξιολόγηση της δέσμευσης πρωτεϊνών.

Κινητική άλλων ιστών

53. Σκοπός των μελετών αυτών είναι η λήψη πληροφοριών χρονικής πορείας για την απάντηση ερωτημάτων σχετικών με θέματα όπως ο τοξικός τρόπος δράσης, η βιοσυσσώρευση και η βιοπαραμονή μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους διάφορους ιστούς. Η επιλογή των ιστών και ο αριθμός των χρονικών στιγμών που αξιολογούνται εξαρτώνται από το ζήτημα που πρόκειται να αντιμετωπιστεί και την τοξικολογική βάση δεδομένων για την ελεγχόμενη χημική ουσία. Ο σχεδιασμός αυτών των πρόσθετων μελετών κινητικής ιστών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη πληροφορίες που συλλέγονται όπως περιγράφεται στις παραγράφους 37-40. Οι μελέτες αυτές ενδέχεται να περιλαμβάνουν μία δόση ή επανειλημμένες δόσεις. Πρέπει να παρέχεται αναλυτική αιτιολόγηση της χρησιμοποιούμενης προσέγγισης.

54. Στους λόγους διεξαγωγής μελετών κινητικής άλλων ιστών ενδέχεται να περιλαμβάνονται οι εξής:

— αποδεικτικά στοιχεία εκτεταμένου χρόνου υποδιπλασιασμού στο αίμα, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή συσσώρευση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε διάφορους ιστούς ή

— ενδιαφέρον να διαπιστωθεί εάν έχει επιτευχθεί επίπεδο σταθερής κατάστασης σε συγκεκριμένους ιστούς (π.χ. σε μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση, παρόλο που ενδέχεται να έχει επιτευχθεί ένα φαινόμενο επίπεδο σταθερής κατάστασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο αίμα, ενδέχεται να υπάρχει ενδιαφέρον να διαπιστωθεί εάν έχει επιτευχθεί επίσης σταθερή κατάσταση και σε ιστούς-στόχους).

55. Για αυτού του είδους τις μελέτες χρονικής πορείας, χορηγείται κατάλληλη δόση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το στόμα σε τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δόση ανά χρονική στιγμή και παρακολουθείται η χρονική πορεία κατανομής σε επιλεγμένους ιστούς. Μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο ένα φύλο, εκτός εάν παρατηρείται φυλοσύνδετη τοξικότητα. Η απόφαση σχετικά με το εάν θα αναλυθεί η ολική ραδιενέργεια ή η μητρική χημική ένωση και/ή οι μεταβολίτες εξαρτάται από το ζήτημα που καλείται να αντιμετωπίσει η μελέτη. Η αξιολόγηση της ιστικής κατανομής πραγματοποιείται με τη χρήση κατάλληλων τεχνικών.

Ενζυμική επαγωγή/παρεμπόδιση

56. Ενδέχεται να απαιτούνται μελέτες που αντιμετωπίζουν τις πιθανές επιδράσεις ενζυμικής επαγωγής/παρεμπόδισης ή βιομετασχηματισμού της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες περιπτώσεις:

1) εάν διαθέσιμα στοιχεία υποδηλώνουν σχέση μεταξύ του βιομετασχηματισμού της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και της ενισχυμένης τοξικότητας·

2) εάν τα διαθέσιμα τοξικολογικά δεδομένα υποδηλώνουν μη γραμμική σχέση μεταξύ δόσης και μεταβολισμού·

▼M4

3) εάν τα αποτελέσματα μελετών ταυτοποίησης μεταβολιτών καταδεικνύουν ταυτοποίηση ενός δυνητικά τοξικού μεταβολίτη που ενδέχεται να έχει παραχθεί από ενζυμική οδό προκαλούμενη από την ελεγχόμενη χημική ουσία·

4) κατά την επεξήγηση επιδράσεων που θεωρείται ότι συνδέονται με φαινόμενα ενζυμικής επαγωγής·

5) εάν παρατηρούνται τοξικολογικά σημαντικές αλλοιώσεις στο μεταβολικό προφίλ της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσω πειραμάτων *in vitro* ή *in vivo* σε διάφορα ειδή ζώων ή υπό διάφορες συνθήκες, ενδέχεται να απαιτείται χαρακτηρισμός του εμπλεκόμενου ενζύμου (των εμπλεκόμενων ενζύμων) (π.χ. ένζυμα φάσης I, όπως ισοένζυμα του εξαρτώμενου από το κυτοχρωμικό P450 συστήματος μονοοξυγενάσης, ένζυμα φάσης II, όπως ισοένζυμα φωσφοτρανσφεράσης ή γλυκουρονοσυλ-τρανσφεράσης φωσφορικής ουριδίνης, ή οποιαδήποτε άλλα σχετικά ένζυμα). Οι πληροφορίες αυτές ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της σημασίας των ειδών για την παρέκταση στα είδη.

57. Πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα πρωτόκολλα μελέτης για την αξιολόγηση τοξικοκινητικών αλλαγών που συνδέονται με την ελεγχόμενη χημική ουσία, τα οποία θα είναι καταλλήλως επικυρωμένα και αιτιολογημένα. Παραδείγματα σχεδιασμού μελέτης περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενη δόση μη ραδιοσημασμένη ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συνοδευόμενη από εφάπαξ δόση ραδιοσημασμένης ουσίας τη 14η ημέρα ή επαναλαμβανόμενη δόση ραδιοσημασμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας και δειγματοληψία την 1η, την 7η και τη 14η ημέρα για τον προσδιορισμό των προφίλ των μεταβολιτών. Η επανειλημμένη χορήγηση ραδιοσημασμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας μπορεί να παρέχει επίσης πληροφορίες σχετικά με τη βιοσυσσώρευση (βλέπε παράγραφο 26).

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

58. Χρήσιμες πληροφορίες για την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό ή την αποικοδόμηση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε ορισμένα είδη είναι δυνατόν να παρέχονται μέσω συμπληρωματικών προσεγγίσεων πέραν των *in vivo* πειραμάτων που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Χρήση πληροφοριών από *in vitro* διαδικασίες

59. Ορισμένα ερωτήματα σχετικά με τον μεταβολισμό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι δυνατόν να απαντηθούν σε μελέτες *in vitro* με τη χρήση κατάλληλων συστημάτων δοκιμής. Προσφάτως απομονωμένα ή καλλιεργημένα ηπατοκύτταρα ή υποκυτταρικά κλάσματα (π.χ. μικροσωμάτια και ενδοκυττάριο υγρό ή κλάσμα S9) από το ήπαρ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη πιθανών μεταβολιτών. Ο τοπικός μεταβολισμός στο όργανο στόχο, π.χ. στους πνεύμονες, ενδέχεται να είναι σημαντικός για την εκτίμηση των κινδύνων. Για τους σκοπούς αυτούς, κλάσματα μικροσωματίων των ιστών στόχου ενδέχεται να αποδειχθούν χρήσιμα. Οι μελέτες που περιλαμβάνουν μικροσωμάτια ενδέχεται να είναι χρήσιμες για την αντιμετώπιση ενδεχόμενων διαφορών μεταξύ των φύλων και των σταδίων ζωής και για τον χαρακτηρισμό ενζυμικών παραμέτρων (K_m και V_{max}) που μπορούν να βοηθήσουν στην αξιολόγηση της εξάρτησης του μεταβολισμού από τη δόση σε σχέση με τα επίπεδα έκθεσης. Επιπλέον, τα μικροσωμάτια ενδέχεται να είναι χρήσιμα για τον προσδιορισμό των ειδικών μικροσωματικών ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και ενδέχεται να είναι σημαντικά για την παρέκταση στα είδη (βλέπε επίσης παράγραφο 56). Το δυναμικό επαγωγής βιομετασχηματισμού μπορεί επίσης να εξεταστεί με τη χρήση ηπατικών υποκυτταρικών κλασμάτων (π.χ. μικροσωματίων και ενδοκυττάριου υγρού) ζώων στα οποία έχει χορηγηθεί προηγουμένως η ελεγχόμενη χημική ουσία, in vitro μέσω μελετών ηπατοκυτταρικής επαγωγής ή από συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τα σχετικά ένζυμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις και υπό κατάλληλες συνθήκες, ενδέχεται να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης υποκυτταρικών κλασμάτων από ανθρώπινους ιστούς για τον προσδιορισμό ενδεχόμενων διαφορών στον βιομετασχηματισμό μεταξύ των ειδών. Τα αποτελέσματα ερευνών in vitro ενδέχεται να είναι επίσης χρήσιμα για την ανάπτυξη μοντέλων PBTK (5).

▼M4

60. Μελέτες δερματικής απορρόφησης in vitro μπορούν να παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες για τον χαρακτηρισμό της απορρόφησης (6).

61. Μπορούν να χρησιμοποιούνται πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων από ηπατικά κύτταρα και προσφάτως ληφθέντα τμήματα ιστών για την απάντηση παρόμοιων ερωτημάτων με αυτά για τα οποία χρησιμοποιούνται μικροσωμάτια του ήπατος. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να μπορεί να δοθεί απάντηση σε συγκεκριμένα ερωτήματα με τη χρήση κυτταρικών σειρών που εκφράζουν συγκεκριμένα το σχετικό ένζυμο ή τεχνητών κυτταρικών σειρών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι χρήσιμη η μελέτη της παρεμπόδισης και της επαγωγής συγκεκριμένων κυτοχρωμικών P 450 ισοενζύμων (π.χ. CYP1A1, 2E1, 1A2 και άλλων) και/ή ενζύμων φάσης II από τη μητρική ένωση με τη χρήση μελετών in vitro. Οι λαμβανόμενες πληροφορίες ενδέχεται να είναι χρήσιμες για άλλες ουσίες με παρόμοια δομή.

Χρήση τοξικοκινητικών δεδομένων από μελέτες τοξικότητας ως συμπληρωματικών πληροφοριών

62. Η ανάλυση δειγμάτων αίματος, ιστών και/ή απεκκριμάτων που λαμβάνονται κατά τη διεξαγωγή οποιωνδήποτε άλλων μελετών τοξικότητας μπορεί να παράσχει δεδομένα για τη βιοδιαθεσιμότητα, τις αλλαγές στη συγκέντρωση στο πλάσμα μέσα στον χρόνο (AUC, C_{max}), το δυναμικό βιοσυσσώρευσης, τους ρυθμούς κάθαρσης και αλλαγές στον μεταβολισμό και την κινητική που συνδέονται με το φύλο ή το στάδιο ζωής.

63. Εξετάζοντας τον σχεδιασμό της μελέτης μπορούν να απαντηθούν ερωτήματα σχετικά με: τον κορεσμό απορρόφησης, τον βιομετασχηματισμό ή οδούς απέκκρισης σε υψηλότερα επίπεδα δόσης· τη λειτουργία νέων μεταβολικών οδών σε υψηλότερες δόσεις και τον περιορισμό των τοξικών μεταβολιτών σε υψηλότερες δόσεις.

64. Άλλα σχετικά με την εκτίμηση των κινδύνων ζητήματα θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν τα εξής:

— σχετική με την ηλικία ευαισθησία λόγω διαφορών στην κατάσταση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, των νεφρών και/ή των δυνατοτήτων αποτοξίνωσης,

— ευαισθησία επιμέρους ομάδων του πληθυσμού λόγω διαφορών στις δυνατότητες βιομετασχηματισμού ή άλλων διαφορών τοξικοκινητικής,

— βαθμός έκθεσης του εμβρύου μέσω διαπλακούντιας μεταφοράς χημικών ουσιών ή του νεογνού μέσω του θηλασμού.

Χρήση τοξικοκινητικής μοντελοποίησης

65. Τα τοξικοκινητικά μοντέλα ενδέχεται να είναι χρήσιμα σε διάφορες πτυχές της εκτίμησης κινδύνων, όπως παραδείγματος χάριν στην πρόβλεψη της συστημικής έκθεσης και της δόσης στους εσωτερικούς ιστούς. Επιπροσθέτως, είναι δυνατόν να απαντηθούν συγκεκριμένα ερωτήματα σχετικά με τον τρόπο δράσης και τα μοντέλα αυτά παρέχουν μια βάση για την παρέκταση μεταξύ των ειδών, τις οδούς έκθεσης, τα μοντέλα χορήγησης δόσεων και την αξιολόγηση του κινδύνου για τον άνθρωπο. Στα δεδομένα που είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη μοντέλων PBTK για μια ελεγχόμενη χημική ουσία σε οποιοδήποτε δεδομένο είδος ζώων περιλαμβάνονται 1) οι συντελεστές κατανομής, 2) οι βιοχημικές σταθερές και οι φυσιολογικές παράμετροι, 3) παράμετροι απορρόφησης που συνδέονται με την οδό έκθεσης, 4) κινητικά δεδομένα *in vivo* για την αξιολόγηση των μοντέλων [π.χ. παράμετροι κάθαρσης για σχετικές (> 10 %) οδούς απέκκρισης, K_m και V_{max} για τον μεταβολισμό]. Τα πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη μοντέλων θα πρέπει να παράγονται με επιστημονικά αξιόπιστες μεθόδους, ενώ τα αποτελέσματα των μοντέλων πρέπει να επικυρώνονται. Παράμετροι που συνδέονται με την ελεγχόμενη χημική ουσία και το είδος, όπως τα ποσοστά απορρόφησης, η κατανομή στο πλάσμα και το αίμα και οι σταθερές μεταβολισμού προσδιορίζονται συχνά για τη διευκόλυνση της ανάπτυξης μοντέλων που δεν αφορούν συγκεκριμένα διαμερίσματα ή μοντέλων που βασίζονται στη φυσιολογία (7).

▼M4

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

66. Συνιστάται η έκθεση της μελέτης να περιλαμβάνει πίνακα περιεχομένων.

Κυρίως μέρος της έκθεσης

67. Το κυρίως μέρος της έκθεσης πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες παρεχόμενες μέσω της παρούσας μεθόδου δοκιμών, οργανωμένες σε ενότητες και παραγράφους ως εξής:

Σύνοψη

68. Η συγκεκριμένη ενότητα της έκθεσης της μελέτης πρέπει να περιλαμβάνει σύνοψη του σχεδιασμού της μελέτης και περιγραφή των χρησιμοποιούμενων μεθόδων. Θα πρέπει επίσης να υπογραμμίζει τα βασικά ευρήματα σχετικά με το ισοζύγιο μάζας, τη φύση και το μέγεθος των μεταβολιτών, τα κατάλοιπα στους ιστούς, τον ρυθμό κάθαρσης, το δυναμικό βιοσυσσώρευσης, διαφορές μεταξύ των δύο φύλων κ.λπ. Η σύνοψη θα πρέπει να είναι αρκετά αναλυτική ώστε να επιτρέπει την αξιολόγηση των ευρημάτων.

Εισαγωγή

69. Η συγκεκριμένη ενότητα της έκθεσης πρέπει να περιλαμβάνει τους στόχους, την αιτιολογία και τον σχεδιασμό της μελέτης, καθώς και κατάλληλες παραπομπές και το ιστορικό πλαίσιο.

Υλικά και μέθοδοι

70. Η συγκεκριμένη ενότητα της έκθεσης πρέπει να περιλαμβάνει λεπτομερείς περιγραφές όλων των σχετικών πληροφοριών, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

α) Ελεγχόμενη χημική ουσία

Η συγκεκριμένη υπο-ενότητα πρέπει να περιλαμβάνει την ταυτοποίηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας: χημική ονομασία, μοριακή δομή, ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής της σύνθεσης, χημική καθαρότητα και, εάν είναι δυνατό, τύπο και ποσότητες τυχόν προσμείξεων. Πρέπει να περιλαμβάνει επίσης πληροφορίες για τις φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της φυσικής κατάστασης, του χρώματος, της μακροσκοπικής διαλυτότητας και/ή του συντελεστή κατανομής, της σταθερότητας και, εάν ενδείκνυται, της διαβρωτικότητας. Εφόσον ενδείκνυται, πρέπει να παρέχονται πληροφορίες για ισομερή. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι ραδιοσημασμένη, η συγκεκριμένη υποενότητα πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες για τα εξής: τον τύπο του ραδιονουκλιδίου, τη θέση της επισήμανσης, την ειδική ραδιενέργεια και τη ραδιοχημική καθαρότητα.

Θα πρέπει να αναφέρεται ο τύπος ή περιγραφή οποιουδήποτε φορέα, αραιωτικών, εναιωρητικών μέσων και γαλακτοματοποιητών ή άλλων υλικών που χρησιμοποιούνται κατά τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

β) Πειραματόζωα

Η συγκεκριμένη υπο-ενότητα πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες για τα πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής και της αιτιολόγησης του είδους, της φυλής και της ηλικίας κατά την έναρξη της μελέτης, του φύλου, καθώς και του βάρους σώματος, της κατάστασης της υγείας και των συνθηκών μεταχείρισης των ζώων.

γ) Μέθοδοι

Η υπο-ενότητα αυτή πρέπει να περιλαμβάνει λεπτομερή στοιχεία για τον σχεδιασμό της μελέτης και τη χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία. Πρέπει να περιλαμβάνει περιγραφή των εξής:

1) αιτιολόγηση οποιασδήποτε τροποποίησης της οδού έκθεσης και των συνθηκών έκθεσης, κατά περίπτωση·

▼M4

2) αιτιολόγηση των επιλεγμένων επιπέδων δόσης·

3) περιγραφή πιλοτικών μελετών που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματικό σχεδιασμό των μελετών παρακολούθησης, κατά περίπτωση. Θα πρέπει να αναφέρονται στοιχεία τεκμηρίωσης των πιλοτικών μελετών·

4) πώς παρασκευάστηκε το διάλυμα δόσης και ο τύπος του διαλύτη ή του φορέα που χρησιμοποιήθηκε, εάν χρησιμοποιήθηκε·

5) αριθμός ομάδων αγωγής και αριθμός ζώων ανά ομάδα·

6) επίπεδα δοσολογίας και όγκος (και ειδική ραδιενέργεια της δόσης, στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ραδιενέργεια)·

7) οδός (οδοί) και μέθοδοι χορήγησης·

8) συχνότητα χορήγησης δόσεων·

9) περίοδος νηστείας (εάν εφαρμόστηκε)·

10) ολική ραδιενέργεια ανά ζώο·

11) συνθήκες μεταχείρισης των ζώων·

12) συλλογή και διαχείριση δειγμάτων·

13) αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό, τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των μεταβολιτών·

14) όριο ανίχνευσης των χρησιμοποιούμενων μεθόδων·

15) άλλες πειραματικές μετρήσεις και διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν (συμπεριλαμβανομένης επικύρωσης των μεθόδων ανάλυσης των μεταβολιτών).

δ) Στατιστική ανάλυση

Εάν χρησιμοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για την ανάλυση των ευρημάτων της μελέτης, θα πρέπει να περιλαμβάνονται η μέθοδος ανάλυσης και το υπολογιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκαν, έτσι ώστε η ανάλυση να μπορεί να επαναξιολογηθεί και να ανακατασκευαστεί από ανεξάρτητους ελεγκτές/στατιστικούς αναλυτές.

Στην περίπτωση μελετών μοντελοποίησης συστημάτων, όπως της μελέτης PBTK, η παρουσίαση των μοντέλων πρέπει να περιλαμβάνει πλήρη περιγραφή του μοντέλου ώστε να είναι δυνατή η ανεξάρτητη ανακατασκευή και επικύρωση του μοντέλου (βλέπε παράγραφο 65 και προσάρτημα: Ορισμοί).

Αποτελέσματα

71. Όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται και να αναφέρονται σε μορφή πίνακα με κατάλληλη στατιστική αξιολόγηση και να περιγράφονται στο κείμενο της ενότητας αυτής. Τα δεδομένα μέτρησης ραδιενέργειας πρέπει να συνοψίζονται και να παρουσιάζονται όπως ενδείκνυται για τη μελέτη, συνήθως ως ισοδύναμα μικρογραμμαρίων ή χιλιοστόγραμμων ανά μάζα δείγματος, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μονάδες. Η ενότητα αυτή πρέπει να περιλαμβάνει γραφικές απεικονίσεις των ευρημάτων, αναπαραγωγή αντιπροσωπευτικών δεδομένων χρωματογραφίας και φασματομετρίας, ταυτοποίηση/ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών και προτεινόμενες μεταβολικές οδούς, συμπεριλαμβανομένης της μοριακής δομής των μεταβολιτών. Επιπροσθέτως, η συγκεκριμένη ενότητα πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες, εφόσον ενδείκνυται:

1) Ποσότητα και ποσοστιαία ανάκτηση ραδιενέργειας στα ούρα, τα κόπρανα, τον εκπνεόμενο αέρα και τα υγρά έκπλυσης των ούρων και των κοπράνων από τους κλωβούς.

— Στην περίπτωση δερματικών μελετών, περιλαμβάνει επίσης δεδομένα για την ανάκτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το εκτεθειμένο δέρμα, τα υγρά έκπλυσης του δέρματος και την εναπομένουσα ραδιενέργεια στο δέρμα που καλύπτει τον εξοπλισμό και τη μεταβολική μονάδα, καθώς τα αποτελέσματα της μελέτης έκπλυσης του δέρματος. Για περισσότερες πληροφορίες, βλέπε παραγράφους 74-77.

▼M4

— Στην περίπτωση αναπνευστικών μελετών, περιλαμβάνει επίσης δεδομένα ανάκτησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από τους πνεύμονες και τους ρινικούς ιστούς (8). Για περισσότερες πληροφορίες, βλέπε παράγραφο 78.

2) Ιστική κατανομή αναφερόμενη ως ποσοστό χορηγούμενης δόσης και συγκέντρωση (ισοδύναμα μικρογραμμαρίων ανά γραμμάριο ιστού) και λόγοι ιστών-αίματος ή ιστών-πλάσματος·

3) Ισοζύγιο ύλης που έχει αναπτυχθεί από κάθε μελέτη που περιλαμβάνει έλεγχο των ιστών και των απεκκριμάτων του σώματος·

4) Συγκεντρώσεις στο πλάσμα και τοξικοκινητικές παράμετροι (βιοδιαθεσιμότητα, AUC, Cmax, Tmax, κάθαρση, χρόνος υποδιπλασιασμού) κατόπιν χορήγησης μέσω της αντίστοιχης οδού (των αντίστοιχων οδών) έκθεσης·

5) Ρυθμός και βαθμός απορρόφησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατόπιν χορήγησης μέσω της αντίστοιχης οδού (των αντίστοιχων οδών) έκθεσης·

6) Ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των μεταβολιτών (αναφερόμενες ως ποσοστό της χορηγούμενης δόσης) που έχουν συλλεχθεί στα απεκκρίματα·

7) Αναφορά σε δεδομένα του προσαρτήματος που περιέχουν στοιχεία για τα επιμέρους ζώα για όλα τα καταληκτικά σημεία μέτρησης (π.χ. χορήγηση δόσεων, ποσοστιαία ανάκτηση, συγκεντρώσεις, τοξικοκινητικές παράμετροι κ.λπ.)·

8) Σχέδιο των προτεινόμενων μεταβολικών οδών και των μοριακών δομών των μεταβολιτών.

Συζήτηση και συμπεράσματα

72. Στην ενότητα αυτή, ο (οι) συντάκτης(-ες) θα πρέπει:

1) να αναφέρει μια προτεινόμενη μεταβολική οδό βάσει των αποτελεσμάτων του μεταβολισμού και της κατανομής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

2) να συζητά οποιεσδήποτε ενδεχόμενες διαφορές που συνδέονται με το είδος και το φύλο σχετικά με την κατανομή και/ή τον βιομετασχηματισμό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

3) να καταρτίσει πίνακα και να αναλύσει την ταυτοποίηση και το μέγεθος των μεταβολιτών, τον ρυθμό κάθαρσης, το δυναμικό βιοσυσσώρευσης και το επίπεδο καταλοίπων της μητρικής ένωσης και/ή των μεταβολιτών στους ιστούς, καθώς και πιθανές δοσοεξαρτώμενες αλλαγές στις τοξικοκινητικές παραμέτρους, κατά περίπτωση·

4) να ενσωματώσει στην ενότητα αυτή τυχόν τοξικοκινητικά δεδομένα που έχουν ληφθεί κατά τη διεξαγωγή μελετών τοξικότητας·

5) να παράσχει ένα περιεκτικό συμπέρασμα το οποίο υποστηρίζεται από τα ευρήματα της μελέτης·

6) να προσθέσει ενότητες (όπως χρειάζεται ή ενδείκνυται).

73. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετες ενότητες ώστε να περιλαμβάνονται στην έκθεση βιβλιογραφικές πληροφορίες, πίνακες, σχήματα, προσαρτήματα κ.λπ.

▼M4

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΟΔΟΙ ΕΚΘΕΣΗΣ

Μέσω του δέρματος

Δερματική έκθεση

74. Η συγκεκριμένη ενότητα παρέχει συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τη διερεύνηση της τοξικοκινητικής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσω του δέρματος. Όσον αφορά τη δερματική απορρόφηση, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το κεφάλαιο B.44 του παρόντος παραρτήματος [Δερματική απορρόφηση: μέθοδος *in vivo* (9)]. Για άλλα καταληκτικά σημεία, όπως η κατανομή και ο μεταβολισμός, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η παρούσα μέθοδος δοκιμών B.36. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα ή περισσότερα επίπεδα δόσης κατά τη δερματική έκθεση. Η ελεγχόμενη χημική ουσία (π.χ. αναραίωτο, αραιωμένο ή μορφοποιημένο υλικό, το οποίο περιέχει την ελεγχόμενη χημική ουσία και εφαρμόζεται στο δέρμα) θα πρέπει να είναι το ίδιο (ή ρεαλιστικό υποκατάστατο) με εκείνο στο οποίο μπορεί να εκτεθούν άνθρωποι ή άλλα πιθανά είδη στόχου. Το επίπεδο (τα επίπεδα) δόσης πρέπει να επιλέγεται(-ονται) σύμφωνα με τις παραγράφους 20-26 της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Παράγοντες που θα μπορούσαν να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή δόσης στο δέρμα περιλαμβάνουν την αναμενόμενη έκθεση του ανθρώπου και/ή τις δόσεις στις οποίες παρατηρήθηκε τοξικότητα σε άλλες μελέτες δερματικής τοξικότητας. Οι δόσεις στο δέρμα πρέπει να αραιώνονται, εάν είναι απαραίτητο, σε κατάλληλο φορέα και να εφαρμόζονται σε όγκο κατάλληλο για τη χορήγηση των δόσεων. Λίγο πριν αρχίσει η δοκιμή το τρίχωμα πρέπει να ψαλιδίζεται από την περιοχή της ράχης του κορμού των πειραματόζωων. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί ξύρισμα για την απομάκρυνση του τριχώματος, αλλά αυτό πρέπει να γίνεται 24 ώρες περίπου πριν από τη δοκιμή. Κατά το κούρεμα ή ξύρισμα του τριχώματος, προσοχή πρέπει να δίνεται ώστε να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος, πράγμα το οποίο μπορεί να μεταβάλει τη διαπερατότητά του. Θα πρέπει να καθαρίζεται περίπου το 10 % της επιφάνειας του σώματος για την εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στην περίπτωση ουσιών υψηλής τοξικότητας, η καλυπτόμενη επιφάνεια μπορεί να είναι μικρότερη, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε όσο το δυνατόν περισσότερη επιφάνεια να καλύπτεται με όσο το δυνατόν πιο λεπτό και ομοιόμορφο στρώμα. Η ίδια επιφάνεια έκθεσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε όλες τις πειραματικές ομάδες δερματικής έκθεσης. Οι περιοχές στις οποίες χορηγούνται οι δόσεις πρέπει να προστατεύονται με κατάλληλο κάλυμμα, το οποίο ασφαλίζεται στη θέση του. Τα ζώα πρέπει να στεγάζονται ατομικά.

75. Πρέπει να διεξάγεται μελέτη έκπλυσης του δέρματος ώστε να αξιολογείται η ποσότητα της εφαρμοζόμενης δόσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που μπορεί να απομακρυνθεί από το δέρμα μέσω έκπλυσης της εκτεθειμένης περιοχής του δέρματος με μαλακό σαπούνι και νερό. Η μελέτη αυτή μπορεί να βοηθήσει επίσης στον καθορισμό του ισοζυγίου μάζας όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του δέρματος. Για τη συγκεκριμένη μελέτη έκπλυσης του δέρματος, πρέπει να εφαρμόζεται μία δόση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε δύο ζώα. Τα επίπεδα δόσης επιλέγονται σύμφωνα με την παράγραφο 23 της παρούσας μεθόδου δοκιμών (βλέπε επίσης παράγραφο 76 σχετικά με τον χρόνο επαφής με το δέρμα). Οι ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που ανακτώνται στα υγρά έκπλυσης θα πρέπει να προσδιορίζονται ώστε να αξιολογείται η αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσω της διαδικασίας έκπλυσης.

76. Η ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμόζεται και να παραμένει στο δέρμα για τουλάχιστον 6 ώρες, εκτός εάν αυτό δεν είναι δυνατό για λόγους διαβρωτικότητας. Κατά τον χρόνο απομάκρυνσης του καλύμματος, η εκτεθειμένη περιοχή θα πρέπει να εκπλένεται ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στη μελέτη έκπλυσης του δέρματος (βλέπε παράγραφο 75). Τόσο το κάλυμμα όσο και τα υγρά έκπλυσης θα πρέπει να αναλύονται για τον εντοπισμό καταλοίπων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Κατά τον τερματισμό των μελετών, κάθε ζώο θα πρέπει να θανατώνεται κατά τρόπο μη βάναυσο σύμφωνα με τη βιβλιογραφική παραπομπή (2), ενώ το εκτεθειμένο δέρμα πρέπει να αφαιρείται. Θα πρέπει να αναλύεται κατάλληλο τμήμα του εκτεθειμένου δέρματος ώστε να προσδιορίζεται τυχόν υπολειπόμενη ελεγχόμενη χημική ουσία (ραδιενέργεια).

77. Για την τοξικοκινητική αξιολόγηση φαρμακευτικών ουσιών, ενδέχεται να απαιτούνται διαφορετικές διαδικασίες, σύμφωνα με το κατάλληλο κανονιστικό σύστημα.

▼M4

Εισπνοή

78. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία συγκέντρωση (ή περισσότερες, εάν χρειάζεται) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Η συγκέντρωση (οι συγκεντρώσεις) θα πρέπει να επιλέγεται(-ονται) σύμφωνα με τις παραγράφους 20-26 της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Οι αναπνευστικές μελέτες πρέπει να διεξάγονται με εξοπλισμό «ρινικού κώνου» ή «κεφαλής» ώστε να αποφεύγεται η απορρόφηση μέσω εναλλακτικών οδών έκθεσης (8). Εάν χρησιμοποιούνται άλλες συνθήκες αναπνευστικής έκθεσης, θα πρέπει να τεκμηριώνεται η συγκεκριμένη τροποποίηση. Η διάρκεια της έκθεσης μέσω της εισπνοής πρέπει να καθορίζεται· μια τυπική έκθεση διαρκεί 4-6 ώρες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) OECD (2009), Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OECD (2000), Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E.G., Kraus L. (2002), Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry, Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, *J. Pharm and Tox Methods* 46: 73-81.

(4) Stumpf W.E. (2005), Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography, *J. Pharmacological and Toxicological Methods* 51: 25-40.

(5) Loizou G., Spendiff M., Barton H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 3rd, Meek B., Gundert-Remy U., Goerlitz G., Schmitt W. (2008), Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50: 400-411.

(6) Κεφάλαιο B.45 του παρόντος παραρτήματος: Δερματική απορρόφηση: Μέθοδος in vitro.

(7) IPCS (2010), Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9, Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Κεφάλαιο B.44 του παρόντος παραρτήματος: Δερματική απορρόφηση: Μέθοδος in vivo.

(10) Barton H.A. et al. (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.

(11) Gibaldi M. και Perrier D., (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

ADME: Ακρωνύμιο των όρων «Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμός και Απέκκριση».

AUC (Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης στο πλάσμα-χρόνου): Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη σε γραφική παράσταση της συγκέντρωσης μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο πλάσμα συναρτήσει του χρόνου. Αντιπροσωπεύει τη συνολική ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας που απορροφάται από το σώμα εντός προκαθορισμένης χρονικής περιόδου. Υπό γραμμικές συνθήκες, η AUC (από χρόνο 0 έως άπειρο) είναι ανάλογη της συνολικής ποσότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που απορροφάται από το σώμα, ανεξαρτήτως του ρυθμού απορρόφησης.

C_{max}: Η μέγιστη συγκέντρωση (αιχμής) στο αίμα (πλάσμα/ορό) μετά τη χορήγηση ή η μέγιστη απέκκριση (αιχμής) (στα ούρα ή τα κόπρανα) μετά τη χορήγηση.

T_{max}: Χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη της τιμής C_{max}.

Απέκκριση: Διεργασίες με τις οποίες η χορηγούμενη χημική ουσία και/ή οι μεταβολίτες της απομακρύνονται από το σώμα.

Απορρόφηση από το στόμα: Το ποσοστό της δόσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που απορροφάται από το σημείο χορήγησης (ήτοι, το γαστρεντερικό σύστημα). Αυτή η κρίσιμη παράμετρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατανόηση του κλάσματος της χορηγούμενης χημικής ουσίας που φθάνει στην πυλαία φλέβα και, εν συνεχεία, στο ήπαρ.

Απορρόφηση: Διεργασίες πρόσληψης χημικών ουσιών από τους ιστούς ή μεταξύ των ιστών. Η απορρόφηση αναφέρεται στη μητρική ένωση και στο σύνολο των μεταβολιτών της. Δεν πρέπει να συγχέεται με τον όρο «βιοδιαθεσιμότητα».

Αυτοραδιογραφία (ολόσωμη αυτοραδιογραφία): Χρησιμοποιούμενη για τον ποιοτικό και/ή ποσοτικό προσδιορισμό της θέσης μιας ραδιενεργού ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους ιστούς, η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί φιλμ ακτίνων Χ ή, προσφάτως, ψηφιακό σύστημα απεικόνισης με φωσφόρους για την απεικόνιση ραδιοσημασμένων μορίων ή τμημάτων μορίων, καταγράφοντας τη ραδιενέργεια που εκπέμπεται στο μελετώμενο αντικείμενο. Η ποσοτική ολόσωμη αυτοραδιογραφία, σε σύγκριση με την ανατομή των οργάνων, ενδέχεται να έχει ορισμένα πλεονεκτήματα για την αξιολόγηση της κατανομής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και την εκτίμηση της συνολικής ανάκτησης και του διαχωρισμού του ραδιενεργού υλικού στους ιστούς. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα, παραδείγματος χάριν, είναι ότι η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μοντέλο ζώων που φέρουν κηλίδες για την εκτίμηση της πιθανής σύνδεσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με τη μελανίνη, η οποία μπορεί να δεσμεύει ορισμένα μόρια. Ωστόσο, παρόλο που προσφέρει εύκολη επισκόπηση των θέσεων σύνδεσης υψηλής χωρητικότητας αλλά χαμηλής συγγένειας σε ολόκληρο το σώμα, η τεχνική αυτή ενδέχεται να υπόκειται σε περιορισμούς όσον αφορά την αναγνώριση συγκεκριμένων θέσεων στόχου, όπως οι θέσεις σύνδεσης με υποδοχείς, όταν απαιτείται σχετικά υψηλή ανάλυση και υψηλή ευαισθησία για την ανίχνευση. Όταν χρησιμοποιείται αυτοραδιογραφία, πρέπει να εκτελούνται πειράματα με σκοπό τον προσδιορισμό του ισοζυγίου μάζας της χορηγούμενης ουσίας, ως χωριστή ομάδα ή σε μελέτη χωριστή από το πείραμα ιστικής κατανομής, όπου όλα τα απεκκρίματα (ενδεχομένως συμπεριλαμβανομένου του εκπνεόμενου αέρα) και ολόκληρα τα σφάγια ομογενοποιούνται και υποβάλλονται σε δοκιμασία με μέτρηση σπινθηρισμού υγρών.

Βιοδιαθεσιμότητα: Κλάσμα της χορηγούμενης δόσης που φθάνει στη συστημική κυκλοφορία ή είναι διαθέσιμο στην περιοχή φυσιολογικής δραστηριότητας. Συνήθως, η βιοδιαθεσιμότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας αναφέρεται στη μητρική ένωση, αλλά μπορεί να αναφέρεται επίσης στους μεταβολίτες της. Αφορά μόνο μία χημική μορφή. *Σημείωση:* Η βιοδιαθεσιμότητα δεν ταυτίζεται με την απορρόφηση. Η διαφορά μεταξύ, π.χ., της απορρόφησης από το στόμα (ήτοι, παρουσία στο τοίχωμα του εντέρου και πυλαία κυκλοφορία) και της βιοδιαθεσιμότητας (ήτοι, παρουσία στο συστημικό αίμα και στους ιστούς) μπορεί να προκύψει από χημική αποδόμηση, λόγω μεταβολισμού στο τοίχωμα του εντέρου

▼M4

ή επαναφοράς εκροής στην εντερική κοιλότητα ή προσυστημικού μεταβολισμού στο ήπαρ, μεταξύ άλλων παραγόντων (10). Η βιοδιαθεσιμότητα του τοξικού στοιχείου (μητρική ένωση ή μεταβολίτης) αποτελεί κρίσιμη παράμετρο κατά την εκτίμηση των κινδύνων για τον άνθρωπο (παρέκταση από την υψηλή δόση σε χαμηλή, παρέκταση από μια οδό σε άλλη) για τον προσδιορισμό εσωτερικής τιμής από την εξωτερική τιμή NOAEL ή BMD (εφαρμοζόμενη δόση). Για την αξιολόγηση των επιδράσεων στο ήπαρ μετά από χορήγηση από το στόμα, αρκεί η απορρόφηση από το στόμα. Ωστόσο, για την αξιολόγηση οποιασδήποτε άλλης επίδρασης πέραν του σημείου εισόδου, η βιοδιαθεσιμότητα και όχι η απορρόφηση αποτελεί γενικά πιο αξιόπιστη παράμετρο για περαιτέρω χρήση στην εκτίμηση των κινδύνων.

Βιομετασχηματισμός: (Συνήθως ενζυματική) χημική μετατροπή μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που ενδιαφέρει σε διαφορετική χημική ουσία μέσα στο σώμα. Συνώνυμο του όρου «μεταβολισμός».

Βιοεμμονή: Βλέπε «Εμμονή».

Βιοσυσσώρευση: Βλέπε «Συσσώρευση».

Γραμμικότητα/γραμμική κινητική: Μια διεργασία είναι γραμμική από πλευράς κινητικής, όταν όλα τα ποσοστά μεταφοράς μεταξύ διαμερισμάτων είναι ανάλογα με τις παρούσες ποσότητες ή συγκεντρώσεις, δηλαδή κινητική πρώτης τάξεως. Επομένως, οι όγκοι κάθαρσης και κατανομής, όπως και ο χρόνος υποδιπλασιασμού, είναι σταθεροί. Οι συγκεντρώσεις που προκύπτουν είναι ανάλογες της δοσολογίας (έκθεση) και η συσσώρευση είναι ευκολότερα προβλέψιμη. Η γραμμικότητα/μη γραμμικότητα μπορεί να εκτιμηθεί με σύγκριση των σχετικών παραμέτρων, π.χ. της AUC, μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων ή από εφάπαξ ή επανειλημμένη έκθεση. Η απουσία εξάρτησης από τη δόση μπορεί να είναι ενδεικτική κορεσμού των ενζύμων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της ένωσης, η αύξηση της AUC μετά από επανειλημμένη έκθεση σε σύγκριση με την εφάπαξ έκθεση μπορεί να αποτελεί ένδειξη παρεμπόδισης του μεταβολισμού, ενώ η μείωση της AUC μπορεί να αποτελεί ένδειξη επαγωγής του μεταβολισμού [βλέπε επίσης (11)].

Διαμέρισμα: Δομικό ή βιοχημικό τμήμα (ή μονάδα) ενός σώματος, ιστού ή κυττάρου, το οποίο είναι διαχωρισμένο από το υπόλοιπο σώμα, ιστό ή κύτταρο.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε χημική ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Εμμονή (βιοεμμονή): Μακρόχρονη παρουσία μιας χημικής ουσίας (σε ένα βιολογικό σύστημα) λόγω της ανθεκτικότητάς της στην αποδόμηση/αποβολή.

Ένζυμα/Ισοένζυμα: Πρωτεΐνες που καταλύουν χημικές αντιδράσεις. Τα ισοένζυμα είναι ένζυμα που καταλύουν ομοειδείς χημικές αντιδράσεις, αλλά διαφέρουν ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων τους.

Ενζυμικές παράμετροι: K_m: σταθερά Michaelis και V_{max}: μέγιστη ταχύτητα

Εξωγενώς: Εισάγεται από το εξωτερικό του οργανισμού ή συστήματος ή παράγεται εκτός αυτού.

Επαγωγή/Ενζυμική επαγωγή: Σύνθεση ενζύμων ως αντίδραση σε περιβαλλοντικό ερέθισμα ή επαγωγικό μόριο.

Επικύρωση μοντέλων: Διαδικασία αξιολόγησης της καταλληλότητας ενός μοντέλου για την περιγραφή των διαθέσιμων τοξικοκινητικών δεδομένων με συνέπεια. Τα μοντέλα μπορούν να αξιολογηθούν με στατιστική και οπτική σύγκριση των προβλέψεών τους με τις πειραματικές τιμές έναντι μιας κοινής ανεξάρτητης μεταβλητής (π.χ. χρόνος). Ο βαθμός αξιολόγησης θα πρέπει να αιτιολογείται σε σχέση με τη σκοπούμενη χρήση του μοντέλου.

Επίπεδα αιχμής στο αίμα (πλάσμα/ορό): Μέγιστη συγκέντρωση (αιχμής) στο αίμα (πλάσμα/ορό) μετά τη χορήγηση (βλ επίσης «C_{max}»).

Επίπεδα σταθερής κατάστασης στο αίμα (πλάσμα): Κατάσταση μη ισορροπίας ενός ανοικτού συστήματος, κατά την οποία όλες οι δυνάμεις που επενεργούν στο σύστημα εξουδετερώνονται από τις αντίρροπες δυνάμεις, κατά τρόπο ώστε όλα τα στοιχεία του να είναι στατικά ως προς τη συγκέντρωση, παρόλο που ρέει ύλη μέσω του συστήματος.

▼M4

Ευαισθησία: Ικανότητα μιας μεθόδου ή ενός οργάνου να κάνει διάκριση μεταξύ αποκρίσεων μέτρησης που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά επίπεδα της εξεταζόμενης μεταβλητής.

Ισοζύγιο μάζας: Λογιστική απεικόνιση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που εισέρχεται στο σύστημα και αυτής που εξέρχεται από αυτό.

Ισοζύγιο ύλης: Βλέπε «ισοζύγιο μάζας».

Ιστική κατανομή: Αναστρέψιμη κίνηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από μια θέση στο σώμα σε μια άλλη. Η ιστική κατανομή μπορεί να μελετηθεί με ανατομή οργάνων, ομογενοποίηση, καύση και μέτρηση σπινθηρισμού υγρών ή με ποιοτική και/ή ποσοτική ολόσωμη αυτοραδιογραφία. Η πρώτη μέθοδος είναι χρήσιμη για τη λήψη στοιχείων σχετικά με τη συγκέντρωση και το ποσοστό ανάκτησης από τους ιστούς και το υπόλοιπο πτώμα των ίδιων ζώων, αλλά δεν προσφέρει ανάλυση όλων των ιστών και ενδέχεται να επιτυγχάνει ποσοστό συνολικής ανάκτησης μικρότερο του ιδανικού (< 90 %). Βλέπε ορισμό της δεύτερης μεθόδου ανωτέρω.

Ιστός-στόχος: Ιστός στον οποίο εκδηλώνεται η κύρια δυσμενής επίδραση μιας τοξικής ουσίας.

Κατανομή: Διασπορά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των παραγώγων της σε έναν οργανισμό.

Κορεσμός: Κατάσταση στην οποία μια ή περισσότερες κινητικές διεργασίες (π.χ. απορρόφηση, μεταβολισμός ή κάθαρση) βρίσκονται σε μέγιστο επίπεδο («έχουν κορεσθεί»).

Μεταβολισμός: Συνώνυμο του όρου «βιομετασχηματισμός».

Μεταβολίτες: Προϊόντα μεταβολισμού ή μεταβολικών διεργασιών.

Μηχανισμός (τρόπος) τοξικότητας/Μηχανισμός (τρόπος) δράσης: Ο μηχανισμός δράσης αναφέρεται στις συγκεκριμένες βιοχημικές αλληλεπιδράσεις μέσω των οποίων μια ελεγχόμενη χημική ουσία προκαλεί τις επιδράσεις της. Ο τρόπος δράσης αναφέρεται σε γενικότερες οδούς που οδηγούν στην τοξικότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

Μικροσκοπική αυτοραδιογραφία υποδοχέων (ή μικροαυτοραδιογραφία υποδοχέων): Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της ξενοβιοτικής αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένες θέσεις των ιστών ή πληθυσμούς κυττάρων, όπως π.χ. στις μελέτες με αντικείμενο τη σύνδεση υποδοχέων ή συγκεκριμένους τρόπους δράσης, οι οποίες ενδέχεται να απαιτούν υψηλή ανάλυση και υψηλή ευαισθησία που πιθανόν να μην είναι εφικτές με άλλες τεχνικές, όπως η ολόσωμη αυτοραδιογραφία.

Μοντελοποίηση συστημάτων (βασιζόμενη στη φυσιολογία τοξικοκινητική, βασιζόμενη στη φαρμακοκινητική, βασιζόμενη στη φυσιολογία φαρμακοκινητική, βασιζόμενη στη βιολογία κ.λπ.). Θεωρητικό μοντέλο που χρησιμοποιεί μαθηματική γλώσσα για να περιγράψει τη συμπεριφορά ενός συστήματος.

Οδοί αποτοξίνωσης: Σειρά σταδίων που οδηγούν στην αποβολή των τοξικών χημικών ουσιών από το σώμα, είτε μέσω μεταβολικής αλλαγής είτε μέσω απέκκρισης.

Οδός χορήγησης: (από το στόμα, ενδοφλεβίως, μέσω του δέρματος, μέσω της εισπνοής): Αναφέρεται στα μέσα με τα οποία οι χημικές ουσίες χορηγούνται στο σώμα (π.χ. από το πεπτικό σύστημα με καθετήρα, από το στόμα με την τροφή, μέσω του δέρματος, μέσω της εισπνοής, ενδοφλεβίως κ.λπ.).

Παρέκταση: Συναγωγή μιας ή περισσότερων άγνωστων τιμών βάσει των τιμών που είναι γνωστές ή έχουν παρατηρηθεί.

Ρυθμός κάθαρσης: Ποσοτικό μέτρο του ρυθμού με τον οποίο μια ελεγχόμενη χημική ουσία απομακρύνεται από το αίμα, το πλάσμα ή έναν ορισμένο ιστό ανά μονάδα χρόνου.

Συγκριτική προσέγγιση: Οι πληροφορίες καταληκτικού σημείου για μία ή περισσότερες χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη του καταληκτικού σημείου της στοχευόμενηςχημικής ουσίας.

▼M4

Συντελεστής κατανομής: Γνωστός και ως συντελεστής μερισμού, αποτελεί μέτρο της διαφορικής διαλυτότητας μιας χημικής ουσίας σε δύο διαλύτες.

Συσσώρευση (Βιοσυσσώρευση): Αύξηση της ποσότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με την πάροδο του χρόνου στους ιστούς (συνήθως στους λιπώδεις ιστούς, μετά από επανειλημμένη έκθεση). Εάν η εισροή μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σώμα είναι μεγαλύτερη από τον ρυθμό αποδόμησής της, ο οργανισμός συσσωρεύει την ελεγχόμενη χημική ουσία και ενδέχεται να σημειωθούν τοξικές συγκεντρώσεις της.

Τοξικοκινητική (φαρμακοκινητική): Μελέτη της απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της απέκκρισης χημικών ουσιών με την πάροδο του χρόνου.

Χολική απέκκριση: Απέκκριση μέσω των χοληδόχων πόρων.

Χρόνος υποδιπλασιασμού ($t_{1/2}$): Ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατά το ήμισυ σε ένα διαμέρισμα. Αναφέρεται συνήθως στη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο πλάσμα ή στην ποσότητά της σε ολόκληρο το σώμα.

▼B

B.37 **ΕΚ ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΟΞΕΙΑ ΕΚΘΕΣΗ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών επιδράσεων των ουσιών, είναι σκόπιμο να εξεταστεί η ικανότητα ορισμένων κατηγοριών ουσιών να προκαλούν ειδικές μορφές νευροτοξικότητας μη δυνάμενες να ανιχνευθούν με άλλες τοξικολογικές μελέτες. Ορισμένες οργανοφωσφορικές ουσίες οι οποίες έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας πρέπει να θεωρηθούν υποψήφιες για μια τέτοια αξιολόγηση.

Για τον εντοπισμό των ουσιών που δύνανται να προκαλέσουν εκ των υστέρων εμφάνιση πολυνευροπάθειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν διερευνητικές δοκιμές *in vitro*. Ωστόσο, αρνητικά αποτελέσματα από τις μελέτες αυτές δεν αποδεικνύουν ότι η ελεγχόμενη ουσία στερείται νευροτοξικής δράσης.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Ως οργανοφωσφορικές ουσίες νοούνται οι χωρίς φορτίο οργανοφωσφορικοί εστέρες, θειοεστέρες ή ανυδρίτες οργανοφωσφορικών, οργανοφωσφονικών, ή οργανοφωσφοραμιδικών οξέων ή ανάλογων φωσφονοθειϊκών, φωσφονοθειικών ή φωσφοροθειοαμιδικών οξέων ή άλλες ουσίες δυνάμενες να προκαλέσουν την εκ των υστέρων νευροτοξική επίδραση που παρατηρείται ορισμένες φορές με αυτή την κατηγορία ουσιών.

Ως εκ των υστέρων εμφανιζόμενη νευροτοξικότητα νοείται σύνδρομο το οποίο εκδηλώνεται με παρατεταμένη εκ των υστέρων εμφάνιση αταξίας, περιφερικών αξονοπαθειών του νωτιαίου μυελού και των περιφερικών νεύρων και με αναστολή και γήρανση της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (neuropathy target esterase — NTE).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Μια ουσία αναφοράς μπορεί να δοκιμαστεί σε μία θετική ομάδα μάρτυρα προκειμένου να καταδειχθεί ότι η απόκριση των ζώων της δοκιμής δεν μεταβλήθηκε σημαντικά υπό τις εργαστηριακές συνθήκες δοκιμής.

Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη νευροτοξική ουσία είναι το φωσφορικό τρι-ο-τολυόλιο (αριθ. CAS 78-30-8, αριθ. EINECS 201-103-5, ονοματολογία CAS: τρις (2-μεθυλο-φαινυλ)εστέρας του φωσφορικού οξέος) γνωστή επίσης ως τρις-ο-φωσφορικός κρεσυλεστέρας.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε μια μόνο δόση από το στόμα σε κατοικίδιες όρνιθες που έχουν προστατευθεί εάν είναι αναγκαίο, από οξείες χολινεργικές επιδράσεις. Τα ζώα παρατηρούνται επί 21 ημέρες για ανωμαλίες στη συμπεριφορά, αταξία και παράλυση, 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση της ουσίας, λαμβάνονται τυχαία ορισμένες όρνιθες από κάθε ομάδα και διενεργούνται βιοχημικές μετρήσεις ιδίως για τον προσδιορισμό της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (NTE). 21 ημέρες μετά την έκθεση, οι υπόλοιπες όρνιθες θανατώνονται και διενεργείται ιστοπαθολογική εξέταση ορισμένων επιλεγμένων νευρικών ιστών.

▼B

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1. **Προετοιμασίες**

Λαμβάνονται τυχαία υγιείς νεαρές ενήλικες όρνιθες οι οποίες δεν πάσχουν από ιογενείς νόσους, δεν βρίσκονται υπό φαρμακευτική αγωγή και δεν παρουσιάζουν

ανωμαλίες στο βάδισμα, και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης.

Χρησιμοποιούνται ευρύχωρα κλουβιά, ή περιφράγματα ώστε οι όρνιθες να μπορούν να κινούνται ελεύθερα και να είναι εύκολη η παρατήρηση του βηματισμού. Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται κανονικά από το στόμα με αναγκαστική θρέψη, ζελατινούχες κάψουλες ή ανάλογη μέθοδο. Οι υγρές ουσίες μπορούν να χορηγούνται χωρίς προηγούμενη αραίωση ή διαλελυμένες σε κατάλληλο φορέα όπως το αραβοσιτέλαιο. Οι στερεές ουσίες πρέπει να διαλύονται, αν είναι δυνατόν, δεδομένου ότι μεγάλες δόσεις στερεών ουσιών σε ζελατινούχες κάψουλες δεν απορροφώνται πάντα ικανοποιητικά. Όταν χρησιμοποιούνται μη υδατικοί φορείς, τα τοξικά χαρακτηριστικά τους πρέπει να είναι γνωστά, και, σε αντίθετη περίπτωση, να προσδιορίζονται πριν από τη δοκιμή.

1.5.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.5.2.1. *Πειραματόζωα*

Συνιστάται να χρησιμοποιούνται νεαρές ενήλικες κατοικίδιες ωοτόκες όρνιθες (Gallus gallus domesticus), ηλικίας 8 έως 12 μηνών, τυποποιημένου μεγέθους, ποικιλίας και φυλής. Οι όρνιθες πρέπει να έχουν εκτραφεί υπό συνθήκες που επιτρέπουν να κινούνται ελεύθερα.

1.5.2.2. *Αριθμός και φύλο*

Εκτός από την ομάδα αγωγής, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια ομάδα μάρτυρας στην οποία χορηγείται μόνο φορέας και μία ομάδα θετικού μάρτυρα. Η ομάδα μάρτυρας που λαμβάνει μόνο φορέα πρέπει να υποβάλλεται στην ίδια ακριβώς διαδικασία με την ομάδα αγωγής παραλείποντας όμως τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας. Ο αριθμός των ζώων που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε ομάδα πρέπει να επαρκεί ώστε να είναι δυνατή η θανάτωση έξι τουλάχιστον ζώων για τη βιοχημική εξέταση (τρία σε καθένα από τα δύο χρονικά σημεία) και η επιβίωση έξι ζώων κατά την περίοδο των 21 ημερών για την παρατήρηση παθολογικών καταστάσεων.

Η ομάδα θετικού μάρτυρα μπορεί να υποβληθεί στη διαδικασία παράλληλα με τις άλλες ομάδες ή να χρησιμοποιηθούν ιστορικά δεδομένα πρόσφατης δοκιμής. Πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον έξι όρνιθες στις οποίες χορηγείται γνωστή ουσία που προκαλεί εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας, τρεις όρνιθες για βιοχημική εξέταση και τρεις όρνιθες για παθολογοανατομική εξέταση. Συνιστάται περιοδική ενημέρωση των δεδομένων του ιστορικού. Όταν το εργαστήριο που εκτελεί τη δοκιμή επιφέρει ουσιαστική αλλαγή στον τρόπο διεξαγωγής της (όσον αφορά επί παραδείγματι τη φυλή των ζώων, τη διατροφή τους, τις συνθήκες στέγασης) πρέπει να αναπαράγονται νέα δεδομένα για την ομάδα θετικού μάρτυρα.

▼B

1.5.2.3. *Επίπεδα δοκιμής*

Διεξάγεται προκαταρκτική μελέτη με κατάλληλο αριθμό ζώων και ομάδων επιπέδων δόσης προκειμένου να καθοριστεί το επίπεδο που θα χρησιμοποιηθεί στην κυρίως μελέτη. Στην προκαταρκτική αυτή μελέτη είναι επιδιωκόμενη μερική θνησιμότητα προκειμένου να προσδιοριστεί κατάλληλη δόση για την κυρίως μελέτη. Ωστόσο, για να αποφευχθούν θάνατοι οφειλόμενοι σε οξείες χολινεργικές επιδράσεις, μπορεί να χορηγηθεί ατροπίνη ή άλλος προστατευτικός παράγων γνωστός ότι δεν επηρεάζει την εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικών φαινομένων. Για τον υπολογισμό της μέγιστης μη θανατηφόρου δόσης των ελεγχόμενων ουσιών είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι (βλέπε μέθοδο Β.1α). Ιστορικά δεδομένα για τις όρνιθες ή άλλα τοξικολογικά στοιχεία μπορούν να είναι επίσης χρήσιμα για την επιλογή της κατάλληλης δόσης. Το επίπεδο δόσης της ελεγχόμενης ουσίας στην κυρίως μελέτη θα πρέπει να είναι το

υψηλότερο δυνατό λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής μελέτης για την επιλογή της δόσης καθώς και το ανώτερο όριο των 2 000 mg/kg βάρους σώματος. Το ποσοστό θνησιμότητας πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να επιβιώσει επαρκής αριθμός ζώων για τη διεξαγωγή των βιοχημικών (έξι) και ιστολογικών (έξι) εξετάσεων την 21η ημέρα. Για την αποφυγή θανάτων οφειλομένων σε οξείες χολινεργικές επιδράσεις χορηγείται ατροπίνη ή άλλος προστατευτικός παράγων που δεν επηρεάζει τις εκ των υστέρων εμφανιζόμενες νευροτοξικές αντιδράσεις.

1.5.2.4. *Οριακή δοκιμή*

Εάν μια δοκιμή που έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, δεν οδηγήσει στην παρατήρηση τοξικών εκδηλώσεων και εάν, βάσει των στοιχείων που διατίθενται για ουσίες ανάλογης δομής δεν αναμένεται εμφάνιση τοξικότητας, είναι δυνατόν να μην απαιτείται μελέτη με υψηλότερη δόση. Η οριακή δοκιμή εφαρμόζεται εφ' όσον από την έκθεση του ανθρώπου δεν προκύψει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επίπεδου δόσης.

1.5.2.5. **Περίοδος παρατήρησης**

Η περίοδος παρατήρησης διαρκεί 21 ημέρες.

1.5.3. **Διαδικασία**

Μετά τη χορήγηση προστατευτικού παράγοντα για την αποφυγή θανάτων οφειλομένων σε οξεία χολινεργική δράση, η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε μία εφ' άπαξ δόση.

1.5.3.1. Γενική παρατήρηση

Η παρατήρηση αρχίζει αμέσως μετά την έκθεση. Όλες οι όρνιθες παρατηρούνται προσεκτικά πολλές φορές ημερησίως τις 2 πρώτες ημέρες και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μια φορά την ημέρα επί 21 ημέρες ή μέχρι την προγραμματισμένη θανάτωσή τους. Καταγράφονται όλες οι εκδηλώσεις τοξικότητας καθώς και ο χρόνος ενάρξεως, ο τύπος, η σοβαρότητα και η διάρκεια των παρατηρούμενων ανωμαλιών στη συμπεριφορά. Η αταξία μετράται βάσει τακτικής βαθμολογικής κλίμακας αποτελούμενης από τέσσερις τουλάχιστον διαβαθμίσεις. Σημειώνεται η εμφάνιση παράλυσης. Τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα οι όρνιθες που έχουν επιλεγεί για την αναζήτηση παθολογικών καταστάσεων απομακρύνονται από τα κλουβιά τους και ακολουθεί περίοδος αναγκαστικής κινητικότητας, όπως το ανέβασμα σκάλας, με σκοπό τη διευκόλυνση της παρατήρησης ανεπαίσθητων τοξικών επιδράσεων. Τα ετοιμοθάνατα ζώα καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν δυσφορία ή πόνο πρέπει να απομακρύνονται, μόλις αυτό γίνει αντιληπτό, να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο και να νεκροτομούνται.

▼B

1.5.3.2. Βάρος σώματος

Όλες οι όρνιθες πρέπει να ζυγίζονται αμέσως πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα,

1.5.3.3. Βιοχημικές εξετάσεις

Επιλέγονται τυχαία έξι όρνιθες από καθεμία από τις ομάδες αγωγής και μάρτυρα που λαμβάνει μόνο φορέα και τρεις όρνιθες από την ομάδα θετικού μάρτυρα, και θανατώνονται λίγες ημέρες μετά την έκθεσή τους. Ο εγκέφαλος και ο οσφυϊκός νωτιαίος μυελός προετοιμάζονται και εξετάζονται για την αναστολή της δράσης της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια. Η εξέταση της αναστολής της εστεράσης αυτής σε ισχιακό νευρικό ιστό μπορεί να είναι επίσης χρήσιμη. Κανονικά, τρία ζώα από την ομάδα μάρτυρα και από καθεμία από τις ομάδες αγωγής θανατώνονται μετά την πάροδο 24 ωρών και τρία ακόμη μετά την πάροδο 48 ωρών, ενώ οι τρεις όρνιθες από την ομάδα θετικού μάρτυρα θανατώνονται έπειτα από 24 ώρες. Εάν, από την παρατήρηση των κλινικών συμπτωμάτων δηλητηρίασης (συνήθως τη στιγμή της εμφάνισης των χολινεργικών δράσεων) προκύψει ότι η αποβολή του τοξικού παράγοντα είναι αργή, είναι προτιμότερο να ληφθούν δείγματα ιστών από τρία ζώα σε δύο χρονικές στιγμές μεταξύ 24 και 72 ωρών μετά τη χορήγηση.

Εάν θεωρείται σκόπιμο, στα δείγματα αυτά μπορεί να προσδιοριστεί και η ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Ωστόσο, μπορεί να συμβεί αυτόματη επαναδραστηριοποίηση της AChE *in vivo*, και να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της δυνατότητας της ουσίας να δρα ως αναστολέας της AChE.

1.5.3.4. Νεκροψία

Η γενική νεκροψία όλων των ζώων (προγραμματισμένη θανάτωση και θανάτωση ετοιμοθάνατων ζώων) πρέπει να περιλαμβάνει παρατήρηση της όψης του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.

1.5.3.5. Ιστοπαθολογική εξέταση

Από τα ζώα που επέζησαν μετά την περίοδο παρατήρησης και δεν χρησιμοποιήθηκαν για βιοχημικές μελέτες λαμβάνονται νευρικοί ιστοί και υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση. Οι ιστοί στερεώνονται in situ με τεχνικές έγχυσης. Λαμβάνονται τομές από την παρεγκεφαλίδα (στο μέσο του διαμήκους άξονα) από τον προμήκη μυελό, τον νωτιαίο μυελό και τα περιφερικά νεύρα. Οι τομές νωτιαίου μυελού πρέπει να προέρχονται από την άνω αυχενική μοίρα, τη μεσοθωρακική και την οσφυοϊερή χώρα. Επίσης πρέπει να λαμβάνονται τομές από την περιφερική περιοχή του κνημιαίου νεύρου και των διακλαδώσεών του στο γαστροκνήμιο μυ καθώς και από το ισχιακό νεύρο. Οι τομές χρώννυνται με κατάλληλες ειδικές για τη μυελίνη και τους νευράξονες χρωστικές.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Κατά κανόνα, αν τα ληφθέντα αποτελέσματα στα τελικά σημεία ελέγχου που επελέγησαν για την παρούσα μέθοδο (βιομηχανικές εξετάσεις, ιστοπαθολογική εξέταση, παρατήρηση της συμπεριφοράς) είναι αρνητικά, δεν απαιτείται συνέχιση των δοκιμών για την εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας. Σε περίπτωση όμως που τα αποτελέσματα είναι ασαφή ή αβέβαια μπορεί να απαιτηθεί περαιτέρω αξιολόγηση.

Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν αλλοιώσεις, αλλαγές στη συμπεριφορά ή βιοχημικές μεταβολές, τον τύπο και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων ή μεταβολών, το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν τις κάθε τύπου και σοβαρότητας αλλοιώσεις ή μεταβολές.

▼B

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης πρέπει να αξιολογούνται βάσει της συχνότητας εμφανίσεώς τους, της σοβαρότητας, και της συσχέτισης των επιδράσεων στη συμπεριφορά, των βιοχημικών και ιστοπαθολογικών επιδράσεων καθώς και όλων των άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν στις ομάδες αγωγής και τις ομάδες μάρτυρες.

Τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους γενικής αποδοχής οι οποίες επιλέγονται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

Για τα πειραματόζωα:

— φυλή,

— αριθμός και ηλικία,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, κ.λπ.,

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Για τις συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα, τη σταθερότητα και την ομοιογένεια της ελεγχόμενης ουσίας, κατά περίπτωση,

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας,

— λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— αιτιολόγηση της επιλογής της δόσης,

— λεπτομερής περιγραφή των δόσεων που χορηγήθηκαν, με στοιχεία για το φορέα, τον όγκο και τη φυσική κατάσταση του χορηγηθέντος προϊόντος,

— ταυτότητα του προστατευτικού παράγοντα που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε και λεπτομέρειες για τον τρόπο χορήγησής του.

Για τα αποτελέσματα:

— δεδομένα για το βάρος του σώματος,

— δεδομένα για την τοξική αντίδραση ανά ομάδα, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας,

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων ή μη),

— αναλυτική περιγραφή των βιοχημικών μεθόδων και των ευρημάτων,

— ευρήματα νεκροψίας,

— αναλυτική περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου απαιτείται.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Η παρούσα μέθοδος είναι παραπλήσια της TG 418 του ΟΟΣΑ.

▼B

B.38 **ΕΚ ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΔΟΣΗΣ 28 ΗΜΕΡΩΝ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών επιδράσεων των ουσιών, είναι σκόπιμο να εξεταστεί η πιθανότητα ορισμένων κατηγοριών ουσιών να προκαλούν ειδικές μορφές νευροτοξικότητας μη δυνάμενες να ανιχνευθούν με άλλες τοξικολογικές μελέτες. Ορισμένες οργανοφωσφορικές ουσίες οι οποίες έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας πρέπει να θεωρηθούν υποψήφιες για μια τέτοια αξιολόγηση.

Για τον εντοπισμό των ουσιών που δύνανται να προκαλέσουν εκ των υστέρων εμφάνιση πολυνευροπάθειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν διερευνητικές δοκιμές *in vitro*. Ωστόσο, αρνητικά αποτελέσματα από τις μελέτες αυτές δεν αποδεικνύουν ότι η ελεγχόμενη ουσία στερείται νευροτοξικής δράσης.

Η δοκιμή εκ των υστέρων εμφανιζόμενης νευροτοξικής επίδρασης 28 ημερών παρέχει πληροφορίες για τους κινδύνους που είναι δυνατόν να προκύψουν για την υγεία μετά από επανειλημμένη έκθεση για ένα περιορισμένο χρονικό διάστημα. Παρέχει πληροφορίες για τη σχέση δόσης-απόκρισης και εκτίμηση για το επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις, δυνάμενες να χρησιμοποιηθούν στον καθορισμό κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Ως οργανοφωσφορικές ουσίες νοούνται οι χωρίς φορτίο οργανοφωσφορικοί εστέρες, θειοεστέρες ή ανυδρίτες οργανοφωσφορικών οργανοφωσφονικών ή οργανοφωσφοραμιδικών οξέων ή ανάλογων φωσφοροθειϊκών, φωσφονοθειϊκών ή φωσφοροθειοαμιδικών οξέων ή άλλες ουσίες δυνάμενες να προκαλέσουν την εκ υστέρων νευροτοξική επίδραση που παρατηρείται ορισμένες φορές με αυτή την κατηγορία ουσιών.

Ως εκ των υστέρων εμφανιζόμενη νευροτοξικότητα νοείται σύνδρομο το οποίο εκδηλώνεται με παρατεταμένη εκ των υστέρων εμφάνιση αταξίας, περιφερικών αξονοπαθειών του νωτιαίου μυελού και των περιφερικών νεύρων και με αναστολή και γήρανση της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (neuropathy target esterase-NTE).

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ημερήσιες δόσης της ελεγχόμενης ουσίας χορηγούνται από το στόμα σε κατοικίδιες όρνιθες επί 28 ημέρες. Τα ζώα παρατηρούνται μια φορά την ημέρα τουλάχιστον, μέχρι την 14η ημέρα μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, για ανωμαλίες στη συμπεριφορά, αταξία και παράλυση. 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, λαμβάνονται τυχαία ορισμένες όρνιθες από κάθε ομάδα και διενεργούνται βιοχημικές μετρήσεις, ιδίως για τον προσδιορισμό της αναστολής της δράσης της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (NTE). Δύο εβδομάδες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, οι υπόλοιπες όρνιθες θανατώνονται και διενεργείται ιστοπαθολογική εξέταση επιλεγμένων νευρικών ιστών.

▼B

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. **Προετοιμασίες**

Λαμβάνονται τυχαία υγιείς νεαρές ενήλικες όρνιθες οι οποίες δεν πάσχουν από ιογενείς νόσους, δεν βρίσκονται υπό φαρμακευτική αγωγή και δεν παρουσιάζουν ανωμαλίες στο βάδισμα και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης.

Χρησιμοποιούνται ευρύχωρα κλουβιά, ή περιφράγματα ώστε οι όρνιθες να μπορούν να κινούνται ελεύθερα και να είναι εύκολη η παρατήρηση του βηματισμού.

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα σε ημερήσιες δόσεις, 7 ημέρες την εβδομάδα, κατά προτίμηση με αναγκαστική θρέψη ή με ζελατινούχες κάψουλες. Οι υγρές ουσίες μπορούν να χορηγούνταν χωρίς προηγούμενη αραίωση ή διαλελυμένες σε κατάλληλο φορέα όπως το αραβοσιτέλαιο. Οι στερεές ουσίες πρέπει να διαλύονται, αν είναι δυνατόν, δεδομένου ότι μεγάλες δόσεις στερεών ουσιών σε ζελατινούχες κάψουλες δεν απορροφώνται πάντα ικανοποιητικά. Όταν χρησιμοποιούνται μη υδατικοί φορείς, τα τοξικά χαρακτηριστικά τους πρέπει να είναι γνωστά, και, σε αντίθετη περίπτωση, να προσδιορίζονται πριν από τη δοκιμή.

1.4.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1. *Πειραματόζωα*

Συνιστάται να χρησιμοποιούνται νεαρές ενήλικες κατοικίδιες ωοτόκες όρνιθες (Gallus gallus domesticus), 8 έως 12 μηνών, τυποποιημένου μεγέθους, ποικιλίας και φυλής. Οι όρνιθες πρέπει να έχουν εκτραφεί υπό συνθήκες που τις επιτρέπουν να κινούνται ελεύθερα.

1.4.2.2. *Αριθμός και φύλο*

Γενικά πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες αγωγής και μια ομάδα μάρτυρας στην οποία χορηγείται μόνο φορέας. Η ομάδα μάρτυρας που λαμβάνει μόνο φορέα πρέπει να υποβάλλεται στην ίδια ακριβώς διαδικασία με την ομάδα αγωγής παραλείποντας όμως τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας.

Ο αριθμός των ζώων που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε ομάδα πρέπει να επαρκεί ώστε να είναι δυνατή η θανάτωση έξι τουλάχιστον ζώων για τη βιοχημική εξέταση (τρία σε καθένα από τα δύο χρονικά σημεία) και η επιβίωση έξι ζώων κατά την περίοδο των 14 ημερών για την παρατήρηση παθολογικών καταστάσεων.

1.4.2.3. *Επίπεδα δόσεων*

Τα επίπεδα δόσεων πρέπει να επιλέγονται λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα δοκιμής για εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικής επίδρασης μετά από οξεία έκθεση καθώς και τυχόν άλλα διαθέσιμα δεδομένα για την τοξικότητα και την κινητική της ελεγχόμενης ένωσης. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να επιλέγεται με στόχο την πρόκληση τοξικών επιδράσεων και κατά προτίμηση εκ των υστέρων εμφανιζόμενων νευροτοξικών επιδράσεων αλλά όχι θανάτου ή έκδηλης δυσφορίας. Στην συνέχεια, επιλέγεται φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσεων με σκοπό να καταδειχθεί τυχόν συνδεόμενη με τη δόση απόκριση και το χαμηλότερο επίπεδο δόσης για το οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις.

▼B

1.4.2.4. *Οριακή δοκιμή*

Εάν μια δοκιμή που έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, δεν οδηγήσει στην παρατήρηση τοξικών εκδηλώσεων και εάν, βάσει των στοιχείων που διατίθενται για ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται εμφάνιση τοξικότητας, είναι δυνατόν να μην απαιτείται μελέτη με υψηλότερη δόση. Η οριακή δοκιμή εφαρμόζεται εφόσον από την έκθεση του ανθρώπου δεν προκύψει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης.

1.4.2.5. *Περίοδος παρατήρησης*

Όλα τα ζώα υποβάλλονται σε καθημερινή τουλάχιστον παρατήρηση κατά την περίοδο της έκθεσής τους και στη συνέχεια, 14 ημέρες ακόμη, εκτός εάν έχει προγραμματιστεί νεκροψία.

1.4.3. **Διαδικασία**

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε ημερήσιες δόσεις, επτά ημέρες την εβδομάδα επί 28 ημέρες.

1.4.3.1. *Γενική παρατήρηση*

Η παρατήρηση αρχίζει αμέσως μετά την έναρξη της αγωγής. Όλες οι όρνιθες παρατηρούνται προσεκτικά τουλάχιστον μια φορά την ημέρα κατά τη διάρκεια των 28 ημερών της αγωγής και επί 14 ημέρες στη συνέχεια ή μέχρι την προγραμματισμένη θανάτωσή τους. Καταγράφονται όλες οι εκδηλώσεις τοξικότητας καθώς και ο χρόνος έναρξης, ο τύπος, η σοβαρότητα και η διάρκειά τους. Οι παρατηρήσεις περιλαμβάνουν τις ανωμαλίες στη συμπεριφορά αλλά δεν περιορίζονται σ' αυτές. Η αταξία μετράται βάσει τακτικής βαθμολογικής κλίμακας αποτελούμενης από τέσσερις τουλάχιστον διαβαθμίσεις. Σημειώνεται η εμφάνιση παράλυσης. Τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα οι όρνιθες απομακρύνονται από τα κλουβιά τους και ακολουθεί περίοδος αναγκαστικής κινητικότητας, όπως το ανέβασμα σκάλας, με σκοπό τη διευκόλυνση της παρατήρησης ανεπαίσθητων τοξικών επιδράσεων. Τα ετοιμοθάνατα ζώα καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν έντονη δυσφορία ή πόνο πρέπει να απομακρύνονται, μόλις αυτό γίνει αντιληπτό, να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο και να νεκροτομούνται.

1.4.3.2. *Βάρος σώματος*

Όλες οι όρνιθες πρέπει να ζυγίζονται αμέσως πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα.

1.4.3.3. *Βιοχημικές εξετάσεις*

Επιλέγονται τυχαία έξι όρνιθες από καθεμία από τις ομάδες αγωγής και μάρτυρα που λαμβάνει μόνο φορέα και θανατώνονται λίγες μέρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, Ο εγκέφαλος και ο οσφυϊκός νωτιαίος μυελός προετοιμάζονται και εξετάζονται για την αναστολή της δράσης της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια. Η εξέταση της αναστολής της εστεράσης αυτής σε ισχιακό νευρικό ιστό μπορεί να είναι επίσης χρήσιμη. Κανονικά, τρία ζώα από την ομάδα μάρτυρα και από καθεμία από τις ομάδες αγωγής θανατώνονται μετά την πάροδο 24 ωρών και τρία ακόμη μετά την πάροδο 48 ωρών από τη χορήγηση της τελευταίας δόσης. Εάν από μελέτες οξείας έκθεσης ή από άλλες μελέτες (τοξικοκινητικής, επί παραδείγματι) προκύπτει ότι είναι προτιμότερο η θανάτωση να πραγματοποιηθεί σε άλλη χρονική στιγμή μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, τότε οι προαναφερόμενοι χρόνοι μεταβάλλονται ανάλογα και η νέα επιλογή αιτιολογείται. Εάν θεωρείται σκόπιμο, στα δείγματα αυτά μπορεί να προσδιοριστεί και η ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Ωστόσο, μπορεί να συμβεί αυτόματη επαναδραστηριοποίηση της AChE *in vivo*, και να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της δυνατότητας της ουσίας να δρα ως αναστολέας της AChE.

▼B

1.4.3.4. *Νεκροψία*

Η γενική νεκροψία όλων των ζώων (προγραμματισμένη θανάτωση και θανάτωση ετοιμοθανάτων ζώων) πρέπει να περιλαμβάνει παρατήρηση της όψης του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.

1.4.3.5. *Ιστοπαθολογική εξέταση*

Από τα ζώα που επέζησαν μετά την περίοδο παρατήρησης και δεν χρησιμοποιήθηκαν για βιοχημικές μελέτες λαμβάνονται νευρικοί ιστοί και υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση. Οι ιστοί στερεώνονται in situ με τεχνικές έγχυσης. Λαμβάνονται τομές από την παρεγκεφαλίδα (στο μέσο του διαμήκους άξονα) από τον προμήκη μυελό, τον νωτιαίο μυελό και τα περιφερικά νεύρα. Οι τομές νωτιαίου μυελού πρέπει να προέρχονται από την άνω αυχενική μοίρα, τη μεσοθωρακική και την οσφυοϊερή χώρα. Επίσης πρέπει να λαμβάνονται τομές από την περιφερική περιοχή του κνημιαίου νεύρου και των διακλαδώσεών του στο γαστροκνήμιο μυ καθώς και από το ισχιακό νεύρο. Οι τομές χρώννυνται με κατάλληλες ειδικές για τη μυελίνη και τους νευράξονες χρωστικές. Αρχικά υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση οι διατηρημένοι ιστοί όλων των ζώων της ομάδας μάρτυρα και της ομάδας που έχει λάβει την υψηλότερη δόση. Εφόσον προκύψουν ενδείξεις νευροτοξικότητας στην ομάδα της υψηλότερης δόσης, υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση και οι όρνιθες των ομάδων στις οποίες χορηγήθηκε ενδιάμεση και χαμηλή δόση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Κατά κανόνα, αν τα ληφθέντα αποτελέσματα στα τελικά σημεία ελέγχου που επελέγησαν για την παρούσα μέθοδο (βιοχημικές εξετάσεις, ιστοπαθολογική εξέταση, παρατήρηση της συμπεριφοράς) είναι αρνητικά, δεν απαιτείται συνέχιση των δοκιμών για την εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας. Σε περίπτωση όμως που τα αποτελέσματα είναι ασαφή ή αβέβαια μπορεί να απαιτηθεί περαιτέρω αξιολόγηση.

Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν αλλοιώσεις, αλλαγές στη συμπεριφορά ή βιοχημικές μεταβολές, τον τύπο και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων ή μεταβολών, το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν τις κάθε τύπου και σοβαρότητας αλλοιώσεις ή μεταβολές.

3. **REPORTING**

TEST REPORT

The test report shall, if possible, include the following information:

3.1. Test animals:

— strain used,

— number and age of animals,

— source, housing conditions, etc.,

— individual weights of animals at the start of the test.

▼B

3.2. Test conditions:

— details of test substance preparation, stability and homogeneity, where appropriate,

— justification for choice of vehicle,

— details of the administration of the test substance,

— details of food and water quality,

— rationale for dose selection,

— specification of doses administered, including details of the vehicle, volume and physical form of the material administered,

— rationale for choosing other times for biochemical determination, if other than 24 and 48 h.

3.3. Results:

— body weight data,

— toxic response data by dose level, including mortality,

— no-observed adverse effect level,

— nature, severity and duration of clinic observations (whether reversible or not),

— a detailed description of biochemical methods and findings,

— necropsy findings,

— a detailed description of all histopathological findings,

— statistical treatment of results, where appropriate.

Discussion of results.

Conclusions.

4. **REFERENCES**

This method is analogous to OECD TG 419.

▼B

B.39. **ΔΟΚΙΜΗ ΜΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ DNA (UDS) ΜΕ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ IN VIVO**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντίγραφο της OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo (1997).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της δοκιμής μη προγραμματισμένης σύνθεσης DNA (UDS) με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* είναι η αναγνώριση ουσιών που επάγουν επιδιόρθωση του DNA στα ηπατικά κύτταρα υποβληθέντων σε αγωγή ζώων (1) (2) (3) (4).

Αυτή η *in vivo* δοκιμή παρέχει μέθοδο για τη διερεύνηση των γονοτοξικών επιδράσεων χημικών ουσιών στο ήπαρ. Το μετρούμενο τελικό σημείο είναι ενδεικτικό της βλάβης του DNA και της επακόλουθης επιδιόρθωσης στα ηπατικά κύτταρα. Το ήπαρ είναι συνήθως ο κυριότερος τόπος μεταβολισμού των απορροφουμένων ενώσεων. Αποτελεί συνεπώς πρόσφορο τόπο για τη μέτρηση της βλάβης του DNA *in vivo*.

Εφόσον υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν θα φθάσει στον ιστό στόχο, δεν ενδείκνυται να χρησιμοποιείται η δοκιμή αυτή.

Το τελικό σημείο της μη προγραμματισμένης σύνθεσης DNA (UDS) μετριέται προσδιορίζοντας την πρόσληψη επισημασμένων νουκλεοτιδίων σε κύτταρα που δεν υπόκεινται σε προγραμματισμένη (S-φάση) σύνθεση DNA. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι ο προσδιορισμός της πρόσληψης επισημασμένης με τρίτιο θυμιδίνης (^{3}H-TdR) με αυτοακτινογράφηση. Για τις *in vivo* δοκιμές UDS χρησιμοποιείται κατά προτίμηση ήπαρ από επίμυες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι ιστοί αντί για ήπαρ, αυτό όμως δεν αποτελεί αντικείμενο της παρούσας μεθόδου.

Η ανίχνευση αποκρίσεως UDS εξαρτάται από τον αριθμό των βάσεων DNA που αποκόπηκαν και αντικαταστάθηκαν στο σημείο της βλάβης. Συνεπώς, η δοκιμή UDS έχει ιδιαίτερη αξία για την ανίχνευση εκτεταμένων επιδιορθώσεων (20-30 βάσεις) που προκαλούνται από ουσίες. Αντιθέτως, οι περιορισμένες επιδιορθώσεις (1-3 βάσεις) ανιχνεύονται με πολύ μικρότερη ευαισθησία. Περαιτέρω, μεταλλαξιγόνα συμβάντα μπορεί να προκύψουν λόγω μη επιδιόρθωσης, κακής επιδιόρθωσης ή κακής αντιγραφής αλλοιώσεων DNA. Η έκταση της απόκρισης UDS δεν αποτελεί ένδειξη για την πιστότητα της διεργασίας επιδιόρθωσης. Επιπλέον, μπορεί ένα μεταλλαξογόνο να αντιδρά με το DNA αλλά η βλάβη του DNA να μην επιδιορθώνεται με τη διεργασία της επιδιόρθωσης αποκοπής. Η έλλειψη εξειδικευμένων πληροφοριών για τη μεταλλαξιγόνο δραστικότητα από τη δοκιμή UDS αντισταθμίζεται από την εν δυνάμει ευαισθησία αυτού του τελικού σημείου επειδή μετριέται σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Κύτταρα σε επιδιόρθωση: καθαρός πυρηνικός κόκκος (NNG) μεγαλύτερος από μία προκαθορισμένη τιμή που πρέπει να αιτιολογείται από το εργαστήριο που διεξάγει τη δοκιμή.

Καθαροί πυρηνικοί κόκκοι (NNG): ποσοτικό μέτρο της UDS δραστικότητας κυττάρων σε αυτοακτινογραφικές δοκιμές UDS που υπολογίζεται αφαιρώντας το μέσο αριθμό κυτταροπλασματικών κόκκων σε πυρηνοϊσοδύναμες κυτταροπλασματικές περιοχές (CG) από τον αριθμό των πυρηνικών κόκκων (NG): NNG=NG-CG. Ο αριθμός των NNG υπολογίζεται για τα μεμονωμένα κύτταρα και κατόπιν αθροίζονται για τα κύτταρα μιας καλλιέργειας, παράλληλων καλλιεργειών, κ.λπ.

▼B

Μη προγραμματισμένη σύνθεση DNA (UDS): Επιδιορθωτική σύνθεση DNA μετά την αποκοπή και απομάκρυνση τμήματος DNA που περιλαμβάνει περιοχή που έχει υποστεί βλάβη προκληθείσα από χημικές ουσίες ή φυσικούς παράγοντες.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η δοκιμή UDS με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* δείχνει επιδιορθωτική σύνθεση DNA μετά την αποκοπή και απομάκρυνση τμήματος DNA που περιλαμβάνει περιοχή που έχει υποστεί βλάβη από χημικές ουσίες ή φυσικούς παράγοντες. Η δοκιμή στηρίζεται συνήθως στην προσθήκη ^{3}H-TdrR στο DNA ηπατικών κυττάρων που εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα κυττάρων στην S -φάση του κυτταρικού κύκλου. Η πρόσληψη ^{3}H-TdR προσδιορίζεται συνήθως με αυτοακτινογράφηση επειδή η τεχνική αυτή δεν είναι τόσο επιδεκτική σε παρεμβολές από κύτταρα S-φάσης όπως. π.χ., η υγρή σπινθηρογραφία.

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1. **Προετοιμασίες**

1.4.1.1. *Επιλογή ζωικών ειδών*

Συνήθως χρησιμοποιούνται επίμυες, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα κατάλληλα είδη θηλαστικών. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές φυλές νεαρών υγιών ενήλικων ζώων. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές στα βάρη των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το ± 20 % του μέσου βάρους για κάθε φύλο.

1.4.1.2. *Συνθήκες στέγασης και διατροφής*

Εφαρμόζονται οι γενικές συνθήκες που αναφέρονται στη γενική εισαγωγή του μέρους Β, αν και ο στόχος για την υγρασία θα πρέπει να είναι 50-60 %.

1.4.1.3. *Προετοιμασία των ζώων*

Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα χωρίζονται τυχαία σε ομάδες μαρτυρίας και αγωγής. Τα κλουβιά θα πρέπει να διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν επιδράσεις από τη θέση των κλουβιών. Τα ζώα λαμβάνουν μία και μοναδική ταυτότητα και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής για να μπορέσουν να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

1.4.1.4. *Υπό δοκιμή ουσία/προετοιμασία*

Στερεές υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν να χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να χορηγούνται απευθείας ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Θα πρέπει vu χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2. **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1. *Διαλύτης/φορέας*

Ο διαλύτης/φορέας δεν θα πρέπει να εμφανίζει τοξική δράση στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεως αλλά ούτε και να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν ανήκει στους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση ενός υδατικού διαλύτη/φορέα.

▼B

1.4.2.2. *Μάρτυρες*

Σε κάθε ανεξαρτήτως εκτελούμενο μέρος της δοκιμής, θα πρέπει να περιλαμβάνονται ταυτόχρονα θετικοί και αρνητικοί (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες. Με εξαίρεση την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία, τα ζώα στις ομάδες μαρτυρίας θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με εκείνο των ζώων στις υποβαλλόμενες σε αγωγή ομάδες.

Οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να είναι ουσίες που είναι γνωστό ότι εμφανίζουν το φαινόμενο της UDS όταν χορηγούνται σε δόσεις εκθέσεως που αναμένεται να δώσουν ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο. Θετικοί μάρτυρες που χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε δόσεις που παρέχουν μέτρια απόκριση (4). Οι δόσεις μπορούν να επιλέγονται έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων στον παρατηρητή. Παραδείγματα ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες είναι:

Χρόνος δειγματοληψίας	Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Πρώτες δειγματοληψίες (2-4 ώρες)	N-νιτροζωδιμεθυλαμίνη	62-75-9	200-249-8
Δεύτερες δειγματοληψίες (12-16 ώρες)	N-2-φλθορενυλοακεταμίδιο (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Ως θετικοί μάρτυρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες κατάλληλες ουσίες. Επίσης, οι θετικοί μάρτυρες μπορούν να χορηγούνται και από οδό διαφορετική από εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας.

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλος αριθμός ζώων ώστε να λαμβάνεται υπόψη η φυσική βιολογική ποικιλία στην απόκριση. Κάθε ομάδα θα πρέπει να αποτελείται από τρία τουλάχιστον ζώα για εξέταση. Εφόσον υπάρχουν σημαντικά πρότερα στοιχεία, για τις ομάδες μάρτυρες, θετικούς και αρνητικούς, απαιτούνται μόνον ένα ή δύο ζώα.

Εάν κατά το χρόνο της έρευνας υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία από μελέτες στο ίδιο είδος και με την ίδια οδό έκθεσης που αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην τοξικότητα μεταξύ των φύλων, τότε αρκεί η δοκιμή να γίνει σε ζώα ενός φύλου, κατά προτίμηση αρσενικά. Εφόσον η έκθεση σε μια χημική ουσία αφορά μόνο το ένα φύλο, όπως π.χ. στην περίπτωση φαρμακευτικών ουσιών, η δοκιμή θα πρέπει να πραγματοποιείται με ζώα του αντίστοιχου φύλου.

1.5.2. **Χρονοδιάγραμμα αγωγής**

Οι εξεταζόμενες ουσίες χορηγούνται εν γένει με μία μόνη αγωγή.

1.5.3. **Επίπεδα δόσεων**

Κανονικά, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο επίπεδα δόσεων. Η μέγιστη δόση ορίζεται ως η δόση που παρέχει σημάδια τοξικότητας τέτοια ώστε τυχόν υψηλότερα επίπεδα δόσης, με βάση το ίδιο δοσολογικό καθεστώς, να αναμένεται φυσιολογικά να οδηγήσουν σε φαινόμενα θνησιμότητας. Γενικά, η χαμηλότερη δόση αντιστοιχεί στο 50 % έως 25 % της υψηλής δόσης.

▼B

Ουσίες με ειδικές βιολογικές δράσεις σε χαμηλές μη τοξικές δόσεις (όπως ορμόνες και μιτωγόνα) μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις στα κριτήρια ρύθμισης των δόσεων και θα πρέπει vu αξιολογούνται κατά περίπτωση. Εάν πραγματοποιηθεί μελέτη διαπίστωσης του εύρους επειδή δεν υπάρχουν κατάλληλα διαθέσιμα δεδομένα, η μελέτη αυτή θα πρέπει να πραγματοποιείται στο ίδιο εργαστήριο, με το ίδιο είδος, φυλή, φύλο και αγωγή που χρησιμοποιούνται και στην κύρια μελέτη.

Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παρέχει ενδείξεις τοξικότητας στο ήπαρ (π.χ. πυκνωτικούς πυρήνες).

1.5.4. **Δοκιμή οριακής δόσης**

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος στην οποία χρησιμοποιείται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ιδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να μην είναι αναγκαία η πραγματοποίηση πλήρους μελέτης. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να δώσει μία ένδειξη για το αν χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5. **Χορήγηση δόσεων**

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται συνήθως με διασωλήνωση χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα ή κατάλληλο σωλήνα διασωλήνωσης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί έκθεσης εφόσον μπορούν να αιτιολογηθούν. Δεν συνιστάται πάντως η ενδοπεριτοναϊκή οδός επειδή με τον τρόπο αυτό το ήπαρ μπορεί να εκτεθεί απευθείας στην υπό δοκιμή) ουσία αντί μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με διασωλήνωση ή έγχυση εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2 ml/100 g βάρους σώματος. Αν χρησιμοποιηθούν μεγαλύτεροι όγκοι, αυτό πρέπει να αιτιολογείται. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται προσαρμόζοντας τη συγκέντρωση ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

1.5.6. **Προετοιμασία των ηπατικών κυττάρων**

Τα ηπατικά κύτταρα λαμβάνονται από υποβληθέντα σε αγωγή ζώα κανονικά 12-16 ώρες μετά τη χορήγηση. Χρειάζεται εν γένει μία πρόσθετη πρώιμη δειγματοληψία (κανονικά 2-4 ώρες μετά την αγωγή) εκτός κι αν υπάρχει σαφής θετική απόκριση στις 12-16 ώρες. Εντούτοις, μπορούν να γίνουν δειγματοληψίες σε εναλλακτικά χρονικά διαστήματα εφόσον τούτο αιτιολογείται με βάση τοξικοκινητικά δεδομένα.

Βραχυπρόθεσμες καλλιέργειες ηπατικών κυττάρων θηλαστικών παρασκευάζονται συνήθως εγχύοντας επιτοπίως στο ήπαρ κολλαγενάση και αφήνοντας τα προσφάτως διασταθέντα ηπατικά κύτταρα να προσκολληθούν σε κατάλληλη επιφάνεια. Τα ηπατικά κύτταρα από αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να εμφανίζουν βιωσιμότητα (5) τουλάχιστον 50 %.

1.5.7. **Προσδιορισμός της UDS**

Προσφάτως απομονωθέντα ηπατικά κύτταρα θηλαστικών επωάζονται συνήθως σε μέσο που περιέχει ^{3}H-TdR για κατάλληλο χρονικό διάστημα, π.χ. 3-8 ώρες. Στο τέλος της περιόδου επωάσεως, το μέσο πρέπει να απομακρύνεται από τα κύτταρα τα οποία μπορούν κατόπιν να επωαστούν σε μέσο που περιέχει περίσσεια μη επισημασμένης θυμιδίνης για να μειωθεί η μη ενσωματωμένη ραδιένεργεια (cold chase). Τα κύτταρα κατόπιν εκπλένονται, στερεώνονται και ξηραίνονται. Για μεγαλύτερους χρόνους επωάσεως, μπορεί να μη χρειάζεται η φάση της «cold chase». Οι αντικει-μενοφόροι πλάκες βυθίζονται σε αυτοακτινογραφικό γαλάκτωμα, εκτίθενται στο σκότος (π.χ. ψύχονται για 7-14 ημέρες), αναπτύσσονται, χρωματίζονται και μετρούνται οι εκτεθειμένοι κόκκοι αργύρου. Για κάθε ζώο ετοιμάζονται δύο έως τρεις αντικειμενοφόροι πλάκες.

▼B

1.5.8. **Ανάλυση**

Τα αντικειμενοφόρα παρασκευάσματα θα πρέπει να περιέχουν ικανό αριθμό κυττάρων κανονικής μορφολογίας για να μπορεί να γίνει σημαντική εκτίμηση της UDS. Τα παρασκευάσματα εξετάζονται με μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν σημάδια έκδηλης κυτταροτοξικότητας (π.χ. πύκνωση, μειωμένα επίπεδα ραδιοεπισήμανσης).

Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να λαμβάνουν ένα κωδικό πριν από την καταμέτρηση των κόκκων. Κανονικά μετρούνται 100 κύτταρα από κάθε ζώο από δύο τουλάχιστον αντικειμενοφόρους πλάκες. Τυχόν καταμέτρηση λιγότερων των 100 κυττάρων/ζώο θα πρέπει να αιτιολογείται. Για τους πυρήνες S-φάσεως δεν μετριέται ο αριθμός κόκκων, μπορεί όμως να καταγραφεί η αναλογία των κυττάρων S-φάσεως.

Η ποσότητα της ενσωματωμένης ^{3}H-TdR στους πυρήνες και το κυτταρόπλασμα μορφολογικώς κανονικών κυττάρων, όπως δεικνύεται από την εναπόθεση κόκκων αργύρου, θα πρέπει να προσδιορίζεται με κατάλληλες μεθόδους.

Προσδιορίζεται ο αριθμός κόκκων στους πυρήνες (πυρηνικοί κόκκοι, NG) και στις πυρηνοϊσοδύναμες περιοχές στο κυτταρόπλασμα (κυτταροπλασματικοί κόκκοι, CG). Οι CG μετρώνται είτε από την ισχυρότερα επισημασμένη περιοχή του κυτταροπλάσματος, είτε από το μέσο όρο δύο ή τριών τυχαίων αριθμών κυτταροπλασματικών κόκκων κοντά στον πυρήνα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι καταμέτρησης (π.χ. καταμέτρηση σε ολόκληρο το κύτταρο) εφόσον υπάρχει κατάλληλη αιτιολόγηση (6).

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Θα πρέπει να δίνονται επιμέρους αποτελέσματα για κάθε αντικειμενοφόρο και κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα. Ο αριθμός των καθαρών πυρηνικών κόκκων (NNG) θα πρέπει να υπολογίζεται για κάθε κύτταρο, για κάθε ζώο και για κάθε δόση και χρονική στιγμή αφαιρώντας τον αριθμό των CG από τον αριθμό των NG. Εφόσον μετρηθούν τα «κύτταρα σε επιδιόρθωση», θα πρέπει τα κριτήρια για τον ορισμό των «κυττάρων σε επιδιόρθωση» να αιτιολογούνται και να στηρίζονται σε προϋπάρχοντα ή παράλληλα στοιχεία αρνητικών μαρτύρων. Αριθμητικά αποτελέσματα μπορούν να εξαχθούν με στατιστικές μεθόδους. Εφόσον χρησιμοποιούνται, οι στατιστικές δοκιμές θα πρέπει να επιλέγονται και να αιτιολογούνται πριν από τη διεξαγωγή της έρευνας.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παραδείγματα κριτηρίων για αποκρίσεις θετικές/αρνητικές είναι τα ακόλουθα:

θετικές
- (i) τιμές NNG μεγαλύτερες ενός προκαθορισμένου κατώτερου ορίου που αιτιολογείται με βάση εργαστηριακά προϋπάρχοντα δεδομένα,
- (ii) τιμές NNG σημαντικά μεγαλύτερες από του παράλληλου μάρτυρα,

αρνητικές ή
- (i) τιμές NNG μέσα ή κάτω από τα προϋπάρχοντα δεδομένα για το κατώτερο όριο μάρτυρα,
- (ii) τιμές NNG μη σημαντικά μεγαλύτερες από τον παράλληλο μάρτυρα.

▼B

Θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των δεδομένων, δηλαδή θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράμετροι όπως η μεταξύ των ζώων διακύμανση, η σχέση δόσης-απόκρισης και η κυτταροτοξικότητα. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι. Πάντως, σε μία θετική απόκριση, δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν την εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστικότητα της υπό δοκίμι] ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από τη δοκιμή USD με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία προκαλεί βλάβη στο DNA σε ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* που μπορεί να επιδιορθωθεί με μη προγραμματισμένη σύνθεση DNA *in vitro*. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν προκαλεί βλάβη στο DNA που να μπορεί να ανιχνευθεί με τη δοκιμή αυτή.

Θα πρέπει να εξετάζεται η πιθανότητα της υπό δοκιμή ουσίας να φθάσει στη γενική κυκλοφορία ή ειδικά στον ιστό στόχο (π.χ. συστεμική τοξικότητα).

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι γνωστές.

Εξετασθέντα ζώα:

— χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— πηγή, συνθήκες στέγασης, δίαιτα, κ.λπ.,

— βάρος των μεμονωμένων ζώων στην έναρξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του εύρος των βαρών σώματος, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

— θετικοί και αρνητικοί (φορέα/διαλύτη) μάρτυρες,

— στοιχεία από τη μελέτη εύρεσης του εύρους, εφόσον έγινε,

— αιτιολογία επιλογής του επιπέδου δόσεως,

— λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας,

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,

— αιτιολογία της επιλεγείσας οδού χορήγησης,

— μέθοδοι επαλήθευσης ότι η υπό δοκιμή ουσία έφθασε στη γενική κυκλοφορία ή στον ιστό στόχο, εφόσον συντρέχει περίπτωση,.

▼B

— μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη δίαιτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον συ\τρέχει περίπτωση,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού,

— λεπτομερής περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας,

— μέθοδοι για τις μετρήσεις της τοξικότητας,

— μέθοδοι προετοιμασίας και καλλιέργειας των ηπατικών κυττάρων,

— χρησιμοποιηθείσα αυτοακτινογραφική τεχνική.

— αριθμός ανικειμενοφόρων πλακών και αριθμοί καταμετρηθέντων κυττάρων,

— κριτήρια αξιολόγησης,

— κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης.

Αποτελέσματα:

— μέσες τιμές κατά αντικειμενοφόρο, ζώο και ομάδα για τους πυρηνικούς κόκκους, κυτταροπλασματικούς κόκκους και καθαρούς πυρηνικούς κόκκους,

— σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,

— στατιστικές εκτιμήσεις, εφόσον υπάρχουν,

— σημάδια τοξικότητας,

— παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες,

— προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,

— αριθμό «κυττάρων σε επιδιόρθωση», εφόσον προσδιορίστηκε,

— αριθμό κυττάρων S-φάσεως, εφόσον προσδιορίστηκε,

— βιωσιμότητα των κυττάρων.

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Ashby,]., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutalion Res.,* 156, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In *Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutalion Res., 189,* pp. 123-133.

(3) Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby,)., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell 1. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), Supplementary *Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures, UKEMS Subcommittee on Guidelines for* Mutagenicity Testing Report. Part *II revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.)., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo,* Mutations Res., 312, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initital Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/*In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.

(6) Mirsalis, |. C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, Environ *Mutagen. 4,* pp. 553-562.

▼B

B.40. **ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ (TER)**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 430 (2004) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διάβρωση του δέρματος αναφέρεται στην πρόκληση μη αναστρέψιμων ιστικών βλαβών στο δέρμα μετά από εφαρμογή του ελεγχόμενου υλικού (όπως ορίζεται από το Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Ουσιών και Μειγμάτων/Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures/GHS) (1). Η παρούσα μέθοδος συνίσταται σε διαδικασία όπου η εκτίμηση της διαβρωτικότητας δεν διενεργείται σε ζωντανά ζώα.

Η εκτίμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα αποτελεί τυπική περίπτωση χρήσης πειραματόζωων (2). Ο προβληματισμός για τον πόνο και την ταλαιπωρία που συνεπάγεται για τα ζώα αυτή η διαδικασία αντανακλάται στην αναθεώρηση της μεθόδου δοκιμών Β.4, η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό της διαβρωτικότητας στο δέρμα με τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων *in vitro,* χωρίς πόνο και ταλαιπωρία.

Ένα πρώτο βήμα προς τον καθορισμό εναλλακτικών δοκιμών, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα για κανονιστικούς σκοπούς, αποτέλεσε η εκπόνηση μελετών προεπικύρωσης (3). Κατόπιν τούτου, εκπονήθηκε (6)(7)(8) επίσημη μελέτη επικύρωσης των μεθόδων *in vitro* για την εκτίμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα (4)(5). Το αποτέλεσμα των εν λόγω μελετών, καθώς και άλλες δημοσιεύσεις, οδήγησαν στη σύσταση να χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες δοκιμές για την εκτίμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα *in vivo* (9)(10)(11): η δοκιμή σε μοντέλο ανθρώπινου δέρματος (βλέπε μέθοδο δοκιμών Β.40α) και η δοκιμή διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (η παρούσα μέθοδος).

Από μελέτη επικύρωσης και άλλες δημοσιευμένες μελέτες προκύπτει ότι η δοκιμή διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER) σε δέρμα επίμυος (12) (13) είναι ικανή να διακρίνει κατά τρόπο αξιόπιστο μεταξύ γνωστών διαβρωτικών και μη διαβρωτικών για το δέρμα ουσιών (5)(9).

Η δοκιμή που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο επιτρέπει τον χαρακτηρισμό των διαβρωτικών χημικών ουσιών και μειγμάτων. Επιτρέπει, επίσης, τον χαρακτηρισμό των μη διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων, όταν υποστηρίζεται από προσδιορισμό του βάρους της μαρτυρίας με χρήση άλλων υφιστάμενων στοιχείων (π.χ. pH, σχέσεις δομής — δραστικότητας, ανθρώπινα και/ή ζωικά δεδομένα) (1)(2)(11)(14). Δεν παρέχει πληροφορίες για τον ερεθισμό του δέρματος, ούτε επιτρέπει την κατάταξη των διαβρωτικών ουσιών σε υποκατηγορίες, όπως προβλέπει το Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης (GHS) (1).

Για πλήρη αξιολόγηση των τοπικών δερματικών επιδράσεων μετά από εφάπαξ δερματική έκθεση, συνιστάται η εφαρμογή της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών (ακολουθιακός έλεγχος) που προσαρτάται στη μέθοδο δοκιμών Β.4 (2) και προβλέπεται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα (1). Η εν λόγω στρατηγική δοκιμών περιλαμβάνει την εκτέλεση δοκιμών *in vitro* για διάβρωση του δέρματος (όπως περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο) και δερματικό ερεθισμό, πριν εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμών σε ζωντανά ζώα.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Διάβρωση του δέρματος *in vivo*: η πρόκληση μη αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα, όπως: ορατή νέκρωση διαμέσου της επιδερμίδας και εντός του χορίου, μετά από εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας για τέσσερις, κατά μέγιστο όριο, ώρες. Οι διαβρωτικές αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από έλκη, αιμορραγία, θρόμβους αίματος και, στο τέλος της δεκατετραήμερης παρακολούθησης, αποχρωματισμό λόγω λεύκανσης του δέρματος, ολόκληρες περιοχές αλωπεκίας και ουλές. Για την αξιολόγηση των αμφισβητήσιμων αλλοιώσεων πρέπει να διερευνάται η δυνατότητα παθολογοανατομικής εξέτασης.

Διαδερμική ηλεκτρική αντίσταση (TER): μέτρο της ηλεκτρικής σύνθετης αντίστασης (εμπέδησης) του δέρματος, σε μονάδες αντίστασης kΩ (κιλοώμ). Πρόκειται για απλή και αξιόπιστη μέθοδο εκτίμησης της φραγματικής λειτουργίας, με καταγραφή της διόδου ιόντων μέσω του δέρματος με τη βοήθεια συσκευής που λειτουργεί με γέφυρα Wheatstone.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Πίνακας 1:

Χημικές ουσίες αναφοράς

Ονομασία	Αριθ. EINECS	Αριθ. CAS	
1,2-Διαμινοπροπάνιο	201-155-9	78-90-0	Ισχυρό διαβρωτικό
Ακρυλικό οξύ	201-177-9	79-10-7	Ισχυρό διαβρωτικό
2-τριτ.-Βουτυλοφαινόλη	201-807-2	88-18-6	Διαβρωτικό
Υδροξείδιο του καλίου (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Διαβρωτικό
Θειικό οξύ (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Διαβρωτικό
Οκτανικό οξύ (καπρυλικό οξύ)	204-677-5	124-07-02	Διαβρωτικό
4-Αμινο-1,2,4-τριαζόλιο	209-533-5	584-13-4	Δεν προκαλεί διάβρωση
Ευγενόλη	202-589-1	97-53-0	Δεν προκαλεί διάβρωση
Φαιναιθυλοβρωμίδιο	203-130-8	103-63-9	Δεν προκαλεί διάβρωση
Τετραχλωροαιθυλένιο	204-825-9	27-18-4	Δεν προκαλεί διάβρωση
Ισοστεατικό οξύ	250-178-0	30399-84-9	Δεν προκαλεί διάβρωση
4-(Μεθυλοθειο)-βενζαλδεϋδη	222-365-7	3446-89-7	Δεν προκαλεί διάβρωση

Οι περισσότερες από τις χημικές ουσίες του ανωτέρω πίνακα έχουν ληφθεί από τον κατάλογο των χημικών ουσιών που επιλέχθηκαν στο πλαίσιο της διεθνούς μελέτης επικύρωσης, του Ευρωπαϊκού Κέντρου Επικύρωσης Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM) (4). Η επιλογή τους βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια:

i) ίσος αριθμός διαβρωτικών και μη διαβρωτικών ουσιών,

▼B

ii) ουσίες του εμπορίου που καλύπτουν τις περισσότερες από τις εν προκειμένω σημαντικές κατηγορίες χημικών προϊόντων,

iii) συνεκτίμηση ισχυρών και λιγότερο ισχυρών διαβρωτικών ουσιών, ώστε να είναι δυνατή η διάκριση βάσει της διαβρωτικής ισχύος,

iv) επιλογή χημικών ουσιών που μπορούν να αποτελέσουν το αντικείμενο εργαστηριακών χειρισμών χωρίς να δημιουργούν άλλους, σοβαρούς κινδύνους πέραν της διαβρωτικότητας.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Το ελεγχόμενο υλικό εφαρμόζεται για διάστημα 24 ωρών, κατά μέγιστο όριο, στην επιδερμική επιφάνεια δίσκων δέρματος σε σύστημα δοκιμών αποτελούμενο από δύο διαμερίσματα, όπου οι δίσκοι δέρματος λειτουργούν ως διαχωριστικό στοιχείο μεταξύ των διαμερισμάτων. Οι δίσκοι δέρματος λαμβάνονται από επίμυες ηλικίας 28-30 ημερών που θανατώνονται με ευθανασία. Τα διαβρωτικά υλικά προσδιορίζονται βάσει της ικανότητάς τους να προκαλούν απώλεια της φυσιολογικής ακεραιότητας και φραγματικής λειτουργίας της κερατίνης στιβάδας, η οποία μετράται ως μείωση της διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER) σε επίπεδα χαμηλότερα μιας τιμής κατωφλίου (12). Για την TER των επιμύων, επιλέχθηκε διαχωριστική τιμή (τιμή αποκοπής/cut-off value) 5 kΩ, βάσει σωρείας δεδομένων για ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, όπου η πλειονότητα των τιμών ήταν είτε σαφώς μεγαλύτερη (συχνά > 10 kΩ) είτε σαφώς μικρότερη (συχνά < 3 kΩ) από την εν λόγω τιμή (12). Κατά κανόνα, τα υλικά που δεν είναι διαβρωτικά σε ζώα, αλλά ερεθιστικά ή μη ερεθιστικά, δεν μειώνουν την TER σε επίπεδα χαμηλότερα από την εν λόγω διαχωριστική τιμή. Επιπλέον, η χρήση άλλων δερματικών παρασκευασμάτων ή άλλου εξοπλισμού ενδέχεται να μεταβάλει τη διαχωριστική τιμή, απαιτώντας περαιτέρω επικύρωση.

Στη διαδικασία της δοκιμής, ενσωματώνεται φάση δέσμευσης χρωστικής για την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων της TER, συμπεριλαμβανομένων των τιμών γύρω από τα 5 kΩ. Με τη φάση δέσμευσης χρωστικής προσδιορίζεται αν η αύξηση της ιονικής διαπερατότητας οφείλεται σε φυσική καταστροφή της κερατίνης στιβάδας. Η μέθοδος TER με χρήση δέρματος επίμυος αποδείχθηκε ότι παρέχει πρόγνωση της διαβρωτικότητας *in vivo* σε κουνέλια, η οποία εκτιμάται με τη μέθοδο δοκιμών Β.4 (2). Σημειωτέον ότι η δοκιμή *in vivo* σε κουνέλια οδηγεί σε άκρως συντηρητική εκτίμηση της διαβρωτικότητας και της ερεθιστικότητας για το δέρμα, συγκρινόμενη με τη δοκιμή σε λωρίδα ανθρώπινου δέρματος (15).

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.5.1. **Ζώα**

Οι επίμυες είναι το καταλληλότερο ζωικό είδος, επειδή ή ευαισθησία του δέρματός τους στις χημικές ουσίες που ελέγχονται με τη συγκεκριμένη δοκιμή έχει καταδειχθεί προηγουμένως (10). Η ηλικία (όταν λαμβάνεται το δέρμα) καθώς και η φυλή του επίμυος είναι ιδιαίτερα σημαντικοί παράγοντες για να εξασφαλιστεί ότι οι θύλακες των τριχών βρίσκονται στο τελογενές στάδιο, πριν από την έναρξη της ανάπτυξης του τριχώματος του ενήλικου ζώου.

▼B

Αφαιρείται προσεκτικά με μικρά ψαλίδια το ραχιαίο και λαγόνιο τρίχωμα από νεαρούς, ηλικίας περίπου 22 ημερών, αρσενικούς ή θηλυκούς επίμυες (της φυλής Wistar ή συγκρίσιμης ποικιλίας). Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα εκπλύνονται προσεκτικά με σφούγγισμα, ενώ η αποτριχωμένη περιοχή εμβαπτίζεται σε αντιβιοτικό διάλυμα (το οποίο περιέχει, επί παραδείγματι, στρεπτομυκίνη, πενικιλλίνη, χλωραμφαινικόλη και αμφοτερικίνη σε κατάλληλες για την αναστολή της βακτηριδιακής ανάπτυξης συγκεντρώσεις). Τα πειραματόζωα εκπλύνονται εκ νέου με αντιβιοτικά την τρίτη ή τέταρτη ημέρα μετά την πρώτη έκπλυση και χρησιμοποιούνται εντός 3 ημερών από την δεύτερη έκπλυση, όταν έχει αποκατασταθεί η κερατίνη στιβάδα μετά την αφαίρεση του τριχώματος.

1.5.2. **Παρασκευή των δίσκων δέρματος**

Τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία σε ηλικία μεταξύ 28-30 ημερών· η εν λόγω ηλικία είναι κρίσιμης σημασίας. Αφαιρείται το ραχιαίο-λαγόνιο δέρμα κάθε ζώου και απαλλάσσεται από την περίσσεια υποδορίου λίπους με προσεκτική απομάκρυνσή του από το δέρμα. Αποσπώνται δίσκοι δέρματος, διαμέτρου περίπου 20mm ο καθένας. Το δέρμα μπορεί να αποθηκευθεί πριν από τη χρήση των δίσκων, εφόσον αποδεικνύεται ότι τα σχετικά με τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες δεδομένα είναι ισοδύναμα με αυτά που λαμβάνονται με πρόσφατο δέρμα.

Κάθε δίσκος δέρματος τοποθετείται επάνω από ένα από τα άκρα σωλήνα πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE), κατά τρόπον ώστε η επιφάνεια της επιδερμίδας να βρίσκεται σε επαφή με τον σωλήνα. Το δέρμα συγκρατείται στη θέση του με τη βοήθεια ελαστικού δακτυλίου «Ο», ο οποίος στερεώνεται με πίεση στο άκρο του σωλήνα, ενώ αποκόπτεται η περίσσεια ιστών. Οι διαστάσεις του σωλήνα και του δακτυλίου «Ο» εμφαίνονται στο Σχήμα 2. Στη συνέχεια, η ένωση του ελαστικού δακτυλίου «Ο» με το άκρο του σωλήνα PTFE στεγανοποιείται με τη βοήθεια βαζελίνης. Ο σωλήνας στερεώνεται με ελατηριωτό σφιγκτήρα μέσα σε υποδοχέα που περιέχει διάλυμα θειικού μαγνησίου ($MgSO_4$) 154 mM (Σχήμα 1). Ο δίσκος δέρματος πρέπει να εμβαπτίζεται πλήρως στο διάλυμα $MgSO_4$. Από ένα και μόνο δείγμα δέρματος επίμυος μπορούν να ληφθούν έως και 10-15 δίσκοι δέρματος.

Πριν από την έναρξη της δοκιμής, μετράται η ηλεκτρική αντίσταση δύο δίσκων δέρματος ως διαδικασία ποιοτικού ελέγχου για κάθε ζωικό δέρμα. Αμφότεροι οι δίσκοι πρέπει να εμφανίζουν τιμές αντίστασης μεγαλύτερες των 10 kΩ για να χρησιμοποιηθούν οι υπόλοιποι δίσκοι στη δοκιμή. Εάν η τιμή αντίστασης είναι κατώτερη των 10 kΩ, οι εναπομένοντες δίσκοι από το εν λόγω δέρμα πρέπει να απορρίπτονται.

1.5.3. **Εφαρμογή των ελεγχόμενων ουσιών και των ουσιών μαρτύρων**

Πρέπει να χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για κάθε μελέτη, ώστε να εξασφαλίζονται επαρκείς επιδόσεις του πειραματικού μοντέλου. Ενδείκνυται η χρήση δίσκων δέρματος από ένα και μόνο ζώο. Οι υποδεικνυόμενες ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες ουσίες είναι το υδροχλωρικό οξύ 10 Μ και το απεσταγμένο νερό, αντιστοίχως.

Οι υγρές ελεγχόμενες ουσίες (150 μL) εφαρμόζονται ομοιόμορφα στην επιδερμική επιφάνεια που βρίσκεται στο εσωτερικό του σωλήνα. Όταν εξετάζονται στερεά υλικά, εφαρμόζεται ομοιόμορφα στο δίσκο επαρκής ποσότητα του στερεού υλικού, ώστε να καλύπτεται το σύνολο της επιφάνειας της επιδερμίδας. Στη συνέχεια προστίθεται απιονισμένο νερό (150 μL) επάνω στο στερεό υλικό και ο σωλήνας ανακινείται ηπίως. Για να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή επαφή με το δέρμα, τα στερεά υλικά ενδέχεται να χρειάζονται θέρμανση στους 30 °C, ώστε η ελεγχόμενη ουσία να υποστεί τήξη ή μαλάκυνση, ή λειοτρίβηση, ώστε να προκύψει κοκκώδες υλικό ή σκόνη.

▼B

Για κάθε ελεγχόμενη ουσία και για κάθε μάρτυρα χρησιμοποιούνται τρεις δίσκοι δέρματος. Οι ελεγχόμενες ουσίες εφαρμόζονται για 24 ώρες στους 20-23 °C. Η ελεγχόμενη ουσία απομακρύνεται με έκπλυση με εκτόξευση τρεχούμενου νερού, θερμοκρασίας έως 30 °C, μέχρις ότου να μην είναι δυνατή η περαιτέρω απομάκρυνση υλικού.

1.5.4. **Μετρήσεις της TER**

Η εμπέδηση του δέρματος μετράται ως TER με τη χρήση γέφυρας Wheatstone (Databridge) εναλλασσόμενου ρεύματος χαμηλής τάσεως (13). Οι γενικές προδιαγραφές της γέφυρας είναι: τάση λειτουργίας 1-3 Volt, ημιτονοειδές ή ορθογώνιο εναλλασσόμενο ρεύμα 50-1 000 Hz και κλίμακα μέτρησης τουλάχιστον 0,1-30 kΩ. Η γέφυρα που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης μετρά την επαγωγή, τη χωρητικότητα και την αντίσταση σε επίπεδα τιμών μέχρι 2 000 H, 2 000 μF και 2 MΩ, αντιστοίχως, σε συχνότητες 100 Hz ή 1 kHz, με τη χρήση σειριακών ή παραλλήλων τιμών. Για τους σκοπούς της δοκιμής διαβρωτικότητας TER, οι μετρήσεις καταγράφονται ως αντίσταση, σε συχνότητα 100 Hz και με τη χρήση σειριακών τιμών. Πριν από τη μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης, ελαττώνεται η επιφανειακή τάση του δέρματος με την προσθήκη αιθανόλης 70 %, στην ποσότητα που απαιτείται για να καλυφθεί η επιδερμίδα. Λίγα δευτερόλεπτα αργότερα, απομακρύνεται η αιθανόλη από τον σωλήνα και ο ιστός ενυδατώνεται με την προσθήκη 3 mL διαλύματος $MgSO_4$ (154 mM). Τα ηλεκτρόδια Databridge τοποθετούνται ανά ένα σε κάθε πλευρά του δίσκου δέρματος για τη μέτρηση της αντίστασης σε kΩ/δίσκο δέρματος (Σχήμα 1). Οι διαστάσεις των ηλεκτροδίων και το μήκος του τμήματος του ηλεκτροδίου που μένει ακάλυπτο κάτω από τους σφιγκτήρες τύπου κροκοδείλου παρέχονται στο Σχήμα 2. Ο σφιγκτήρας του εσωτερικού ηλεκτροδίου ακουμπάει στην κορυφή του σωλήνα PTFE κατά τη μέτρηση της αντίστασης, ώστε να εξασφαλίζεται η εμβάπτιση σταθερού τμήματος του ηλεκτροδίου στο διάλυμα $MgSO_4$. Το εξωτερικό ηλεκτρόδιο τοποθετείται μέσα στον υποδοχέα κατά τρόπο ώστε να ακουμπάει στον πυθμένα του. Η απόσταση μεταξύ του ελατηριωτού σφιγκτήρα και του πυθμένα του σωλήνα PTFE διατηρείται σταθερή (Σχήμα 2), δεδομένου ότι επηρεάζει τη λαμβανόμενη τιμή αντίστασης. Κατά συνέπεια, η απόσταση μεταξύ του εσωτερικού ηλεκτροδίου και του δίσκου δέρματος πρέπει να είναι σταθερή και ελάχιστη (1-2 mm).

Σε περίπτωση που η μετρούμενη τιμή αντίστασης υπερβαίνει τα 20 kΩ, αυτό οφείλεται ενδεχομένως σε κατάλοιπα της ελεγχόμενης ουσίας που επικαλύπτουν την επιδερμική επιφάνεια του δίσκου δέρματος. Μπορεί να επιχειρηθεί περαιτέρω απομάκρυνση της εν λόγω επικάλυψης, λόγου χάριν κλείνοντας το στόμιο του σωλήνα PTFE με το δάκτυλο, φορώντας γάντια, και ανακινώντας τον επί 10 δευτερόλεπτα περίπου. Το διάλυμα $MgSO_4$ απορρίπτεται και η μέτρηση της αντίστασης επαναλαμβάνεται με νέο διάλυμα $MgSO_4$.

Τα χαρακτηριστικά και οι διαστάσεις της χρησιμοποιούμενης συσκευής δοκιμών καθώς και η ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία ενδέχεται να επηρεάσουν τις λαμβανόμενες τιμές TER. Το όριο διαβρωτικότητας των 5 kΩ υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα τα οποία ελήφθησαν με τη συγκεκριμένη συσκευή και διαδικασία που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο. Σε περίπτωση μεταβολής των συνθηκών της δοκιμής ή χρήσης άλλης συσκευής είναι δυνατόν να ισχύουν διαφορετικά όρια και διαφορετικές τιμές για τους μάρτυρες. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαία η βαθμονόμηση των μεθοδολογικών παραγόντων και των τιμών κατωφλίου της αντίστασης, με τη δοκιμή σειράς προτύπων αναφοράς, επιλεγμένων από τις χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης (4)(5) ή από κατηγορίες παρόμοιες με αυτές των υπό διερεύνηση χημικών ουσιών. Στον πίνακα 1 εμφαίνεται μια σειρά κατάλληλων χημικών ουσιών αναφοράς

▼B

1.5.5. **Μέθοδοι δέσμευσης χρωστικής**

Η έκθεση ορισμένων μη διαβρωτικών υλικών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της αντίστασης κάτω από τη διαχωριστική τιμή των 5 kΩ, επιτρέποντας τη δίοδο ιόντων μέσω της κερατίνης στιβάδας και μειώνοντας, συνεπώς, την ηλεκτρική αντίσταση (5). Λόγου χάριν, ουδέτερες οργανικές ενώσεις και επιφανειοδραστικές χημικές ουσίες (συμπεριλαμβανομένων των απορρυπαντικών, των γαλακτωματοποιητών και άλλων επιφανειοδραστικών παραγόντων) μπορούν να απομακρύνουν τα δερματικά λιπίδια, αυξάνοντας τη διαπερατότητα του φράγματος στα ιόντα. Εάν λοιπόν οι τιμές TER των ελεγχόμενων ουσιών είναι μικρότερες των 5 kΩ ή γύρω από αυτή την τιμή και δεν παρατηρείται ορατή βλάβη, πρέπει να διενεργείται εκτίμηση της διείσδυσης χρωστικής στους ιστούς μάρτυρες και στους ιστούς που υποβλήθηκαν σε αγωγή, ώστε να διαπιστώνεται αν οι τιμές TER οφείλονται σε αυξημένη διαπερατότητα ή διάβρωση του δέρματος (3) (5). Στη δεύτερη περίπτωση, όπου εμφανίζεται λύση της συνεχείας της κερατίνης στιβάδας, η χρωστική σουλφοροδαμίνη Β, όταν φέρεται στην επιφάνεια του δέρματος, διεισδύει ταχέως και χρωματίζει τον υποκείμενο ιστό. Η συγκεκριμένη αυτή χρωστική είναι σταθερή σε ευρύ φάσμα χημικών ουσιών και δεν επηρεάζεται από την κατωτέρω περιγραφόμενη εκχυλιστική διαδικασία.

1.5.5.1. *Εφαρμογή και απομάκρυνση της χρωστικής σουλφοροδαμίνης Β*

Μετά την εκτίμηση της TER, το θειικό μαγνήσιο αποχύνεται από τον σωλήνα και το δέρμα εξετάζεται προσεκτικά για εμφανείς βλάβες. Εάν δεν υπάρχει εμφανής σοβαρή βλάβη, 150 μL διαλύματος χρωστικής σουλφοροδαμίνης Β (ερυθρά χρωστική Acid Red 52, C.I. 45100, αριθ. EINECS 222-529-8, αριθ. CAS 3520-42-1) 10 % (w/v) σε απεσταγμένο νερό εφαρμόζονται στην επιδερμική επιφάνεια κάθε δίσκου δέρματος για 2 ώρες. Στη συνέχεια, οι εν λόγω δίσκοι δέρματος εκπλύνονται με τρεχούμενο νερό θερμοκρασίας δωματίου, κατ' ανώτατο όριο, για 10 περίπου δευτερόλεπτα, ώστε να απομακρυνθεί η τυχόν πλεονάζουσα/αδέσμευτη χρωστική. Κάθε δίσκος δέρματος αφαιρείται από τον σωλήνα PTFE και τοποθετείται σε φιαλίδιο (π.χ. γυάλινο φιαλίδιο σπινθηρισμού των 20 ml) που περιέχει απιονισμένο νερό (8 ml). Τα φιαλίδια ανακινούνται ηπίως επί 5 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί η τυχόν εναπομένουσα αδέσμευτη χρωστική. Επαναλαμβάνεται η έκπλυση και, στη συνέχεια, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται και τοποθετούνται σε φιαλίδια που περιέχουν 5ml διαλύματος δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS) 30 % (w/v) σε απεσταγμένο νερό και ακολουθεί επώαση όλη τη νύχτα στους 60 °C.

Μετά την επώαση, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται από τα φιαλίδια και απορρίπτονται, ενώ το εναπομένον διάλυμα φυγοκεντρείται επί 8 λεπτά στους 21 °C (σχετική φυγόκεντρος δύναμη - 175 × g). Από την υπερκείμενη στιβάδα λαμβάνεται δείγμα 1 ml και αραιώνεται σε αναλογία 1 προς 5 (v/v) [δηλαδή 1 ml + 4 ml] με διάλυμα SDS 30 % (w/v) σε απεσταγμένο νερό. Μετράται η οπτική πυκνότητα του διαλύματος σε μήκος κύματος 565 nm.

1.5.5.2. *Υπολογισμός της περιεκτικότητας σε χρωστική*

Η περιεκτικότητα κάθε δίσκου σε χρωστική σουλφοροδαμίνη Β υπολογίζεται με βάση τις τιμές οπτικής πυκνότητας (5) (μοριακή απορροφητικότητα της σουλφοροδαμίνης Β στα 565 nm = $8,7 \times 10^4$, μοριακό βάρος = 580). Προσδιορίζεται η περιεκτικότητα κάθε δίσκου δέρματος σε χρωστική με τη χρήση κατάλληλης καμπύλης βαθμονόμησης και στη συνέχεια υπολογίζεται η μέση περιεκτικότητα σε χρωστική για τα πολλαπλά δείγματα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Οι τιμές αντίστασης (kΩ) και, κατά περίπτωση, οι μέσες τιμές περιεκτικότητας σε χρωστική (μg/δίσκο) για το ελεγχόμενο υλικό, καθώς και για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες πρέπει να αναφέρονται σε μορφή πίνακα (μεμονωμένα δεδομένα δοκιμής και μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση), συμπεριλαμβανομένων των δεδομένων για τα πολλαπλά δείγματα/επαναληπτικές δοκιμές, με μέσες και μεμονωμένες τιμές.

▼B

2.1. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι προκύπτοντες μέσοι όροι TER γίνονται δεκτοί εφόσον οι τιμές για τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα, οι οποίοι ελέγχθηκαν ταυτόχρονα, περικλείονται στα αποδεκτά για τη μέθοδο πεδία τιμών στο εργαστήριο που εκτελεί τη δοκιμή. Τα αποδεκτά πεδία τιμών αντίστασης, για τη μεθοδολογία και τη συσκευή που περιγράφονται ανωτέρω, παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

Μάρτυρας	Ουσία	Πεδίο τιμών ηλεκτρικής αντίστασης (kΩ)
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ 10M	0,5-1,0
Αρνητικός	Απεσταγμένο νερό	10-25

Οι προκύπτουσες μέσες τιμές δέσμευσης χρωστικής γίνονται δεκτές εφόσον οι τιμές για τους μάρτυρες, οι οποίοι ελέγχθηκαν ταυτόχρονα, περικλείονται στα αποδεκτά για τη μέθοδο πεδία τιμών. Τα υποδεικνυόμενα αποδεκτά πεδία τιμών περιεκτικότητας σε χρωστική για τις ουσίες μάρτυρες, για τη μεθοδολογία και τη συσκευή που περιγράφονται ανωτέρω, παρρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

Μάρτυρας	Ουσία	Πεδίο τιμών περιεκτικότητας σε χρωστική **(μg/δίσκο)**
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ 10M	40-100
Αρνητικός	Απεσταγμένο νερό	15-35

Η ελεγχόμενη ουσία θεωρείται ως μη διαβρωτική για το δέρμα, εάν:

i) η λαμβανόμενη μέση τιμή TER για την ελεγχόμενη ουσία είναι μεγαλύτερη των 5 kΩ ή

ii) η μέση τιμή TER είναι ίση με 5 kΩ ή μικρότερη και

— ο δίσκος δέρματος δεν παρουσιάζει εμφανή βλάβη και

— η μέση περιεκτικότητα του δίσκου σε χρωστική είναι πολύ κατώτερη της μέσης περιεκτικότητας του δίσκου σε χρωστική που λαμβάνεται, ταυτόχρονα, με τον θετικό μάρτυρα HCl 10M.

Η ελεγχόμενη ουσία θεωρείται ως διαβρωτική για το δέρμα, εάν:

i) η μέση τιμή TER είναι ίση με 5 kΩ ή μικρότερη και ο δίσκος δέρματος παρουσιάζει εμφανή βλάβη ή

ii) η μέση τιμή TER είναι ίση με 5 kΩ ή μικρότερη και

— ο δίσκος δέρματος δεν παρουσιάζει εμφανή βλάβη, αλλά

— η μέση περιεκτικότητα του δίσκου σε χρωστική είναι μεγαλύτερη ή ίση με τη μέση περιεκτικότητα του δίσκου σε χρωστική που λαμβάνεται, ταυτόχρονα, με τον θετικό μάρτυρα HCl 10M.

▼B

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία και μάρτυρες:

— χημική(-ές) ονομασία(-ες), όπως κατά IUPAC ή ονομασία CAS και αριθμός CAS, εφόσον αυτά είναι γνωστά,

— καθαρότητα και σύνθεση της ουσίας ή του παρασκευάσματος (σε επί τοις εκατό ποσοστό(ά) κατά βάρος) και φύση της(του),

— φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως φυσική κατάσταση, pH, σταθερότητα, υδατοδιαλυτότητα, που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,

— κατεργασία των ελεγχόμενων ουσιών/μαρτύρων πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— σταθερότητα, εφόσον είναι νωστή.

Πειραματόζωα:

— χρησιμοποιούμενη φυλή και φύλο,

— ηλικία των ζώων όταν χρησιμοποιήθηκαν ως ζώα δότες,

— προέλευση, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσια κ.λπ.,

— λεπτομέρειες για το δερματικό παρασκεύασμα.

Συνθήκες δοκιμής:

— καμπύλες βαθμονόμησης της συσκευής της δοκιμής,

— καμπύλες βαθμονόμησης για την εκτέλεση της δοκιμής δέσμευσης χρωστικής,

— λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμών που εφαρμόστηκε για τις μετρήσεις της TER,

— κατά περίπτωση, λεπτομέρειες της διαδικασίας δοκιμών που εφαρμόστηκε για την εκτίμηση της δέσμευσης χρωστικής,

— περιγραφή των ενδεχόμενων τροποποιήσεων των διαδικασιών της δοκιμής,

— περιγραφή των χρησιμοποιηθέντων κριτηρίων αξιολόγησης.

Αποτελέσματα:

— παρουσίαση, σε πίνακα, των δεδομένων από τη δοκιμασία TER και τη δοκιμασία δέσμευσης χρωστικής (κατά περίπτωση) για τα επιμέρους ζώα και δείγματα δέρματος,

— περιγραφή κάθε επίδρασης που παρατηρήθηκε.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

2. Μέθοδος δοκιμών Β.4. Οξεία τοξικότητα: ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. *in Vitro* 12, 471-482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. *in Vitro* 12, 483-524.

6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

9. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

10. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In Vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

11. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st –2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

12. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507-512.

▼B

13. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro:* results of an interlaboratory trial. Toxic. *in Vitro* 6, 191-194.

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

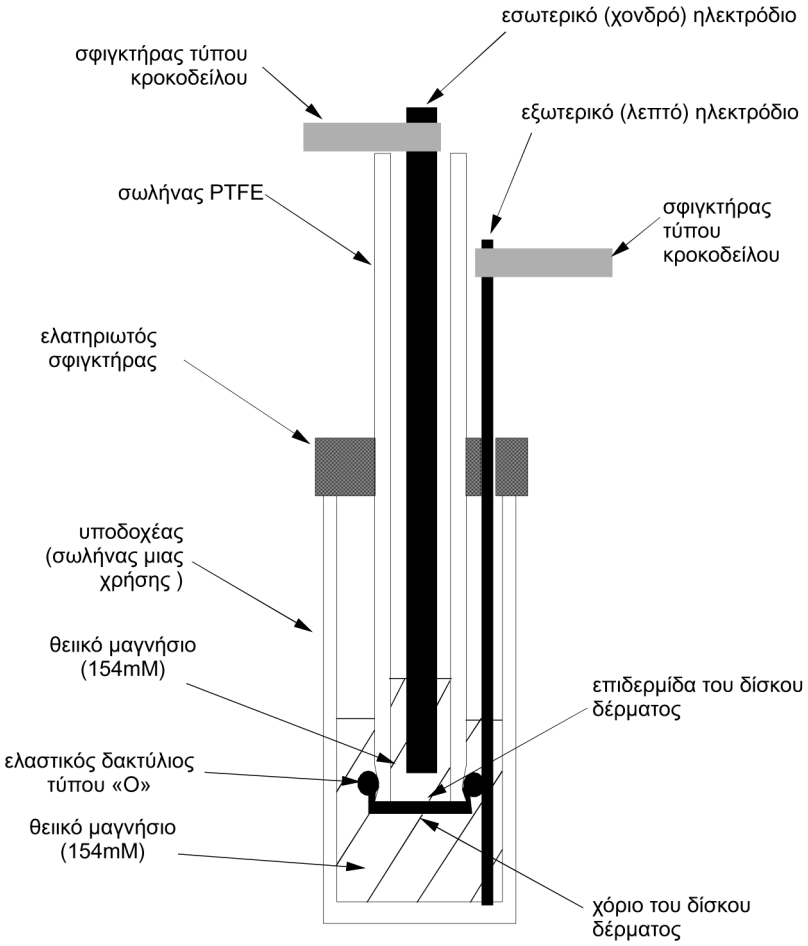
15. Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845-852.

16. Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An *In Vitro* model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxic. *in Vitro*. 2, 7-17.

▼B

Σχήμα 1:

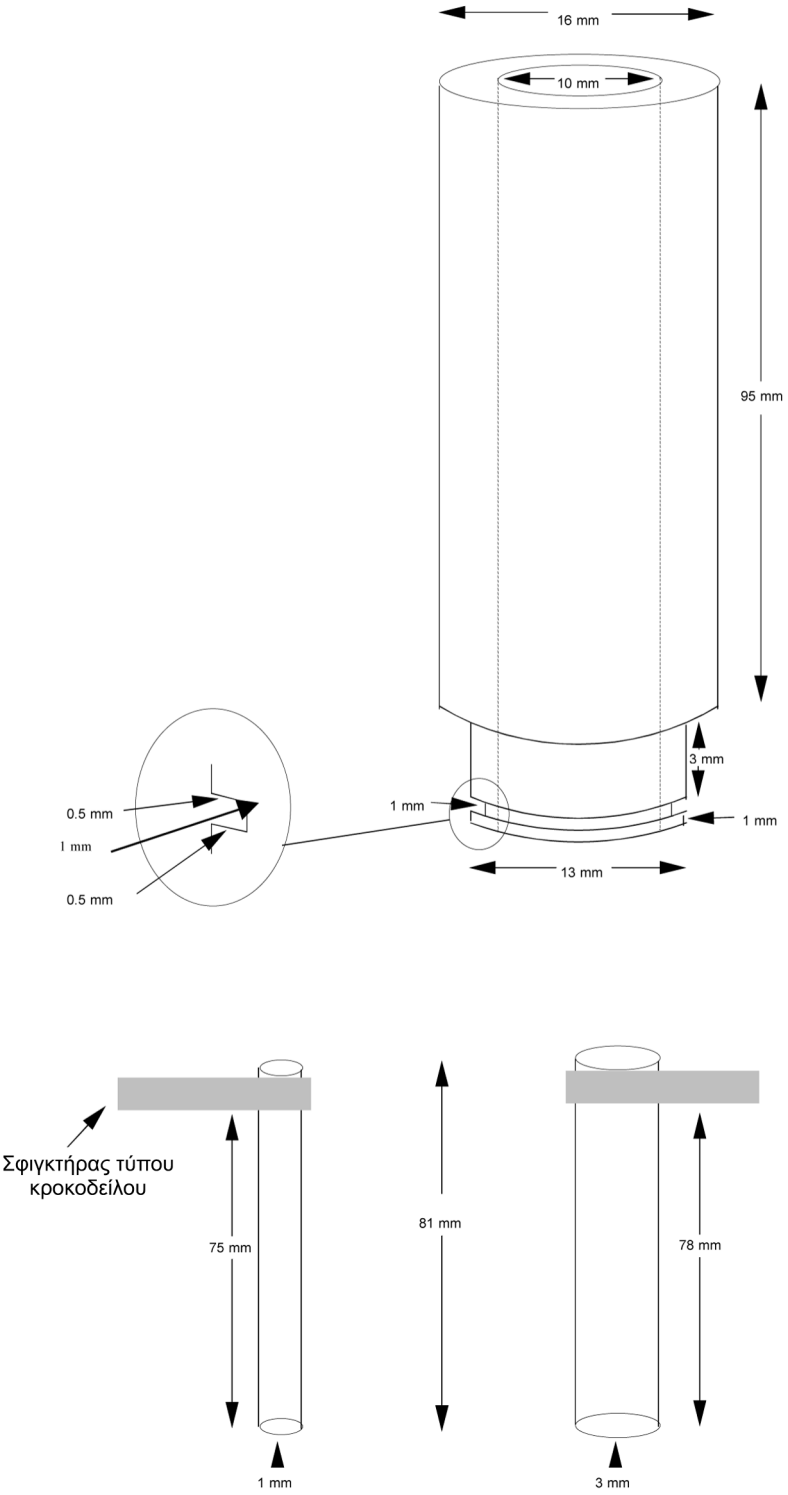
Συσκευή για τη δοκιμή TER σε δέρμα επίμυος



▼B

Σχήμα 2:

Διαστάσεις του σωλήνα πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PFTE), του υποδοχέα και των ηλεκτροδίων που χρησιμοποιήθηκαν



▼B

Κρίσιμοι παράγοντες ως προς την ανωτέρω συσκευή:

— η εσωτερική διάμετρος του σωλήνα PTFE·

— το μήκος των ηλεκτροδίων σε σχέση με τον σωλήνα PTFE και τον υποδοχέα, ώστε ο δίσκος δέρματος να μην ακουμπά στα ηλεκτρόδια και ένα σταθερού μήκους τμήμα ηλεκτροδίου να βρίσκεται σε επαφή με το διάλυμα MgSO4·

— η ποσότητα διαλύματος $MgSO_4$ στον υποδοχέα πρέπει να εξασφαλίζει βάθος του υγρού, σε σχέση με τη στάθμη του στο σωλήνα PFTE, όπως εμφαίνεται στο Σχήμα 1·

— ο δίσκος δέρματος πρέπει να στερεώνεται ικανοποιητικά στον σωλήνα PFTE, ώστε η ηλεκτρική αντίσταση να αποτελεί πραγματικό μέτρο των ιδιοτήτων του δέρματος.

▼B

B.40α. **ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO:* ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 431 (2004) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διάβρωση του δέρματος αναφέρεται στην πρόκληση μη αναστρέψιμων ιστολογικών βλαβών στο δέρμα μετά από εφαρμογή του ελεγχόμενου υλικού (όπως ορίζεται από το Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Ουσιών και Μειγμάτων/Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures/GHS) (1). Η παρούσα μέθοδος συνίσταται σε διαδικασία όπου η εκτίμηση της διαβρωτικότητας δεν διενεργείται σε ζωντανά ζώα.

Η εκτίμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα αποτελεί τυπική περίπτωση χρήσης πειραματόζωων (2). Ο προβληματισμός για τον πόνο και την ταλαιπωρία που συνεπάγεται για τα ζώα αυτή η διαδικασία αντανακλάται στην αναθεώρηση της μεθόδου δοκιμών B.4, η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό της διαβρωτικότητας στο δέρμα με τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων *in vitro,* χωρίς πόνο και ταλαιπωρία.

Ένα πρώτο βήμα προς τον καθορισμό εναλλακτικών δοκιμών, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα για κανονιστικούς σκοπούς, αποτέλεσε η εκπόνηση μελετών προεπικύρωσης (3). Κατόπιν τούτου, εκπονήθηκε (6)-(7)(8) επίσημη μελέτη επικύρωσης των μεθόδων *in vitro* για την εκτίμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα (4)(5). Το αποτέλεσμα των εν λόγω μελετών, καθώς και άλλες δημοσιεύσεις, οδήγησαν στη σύσταση να χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες δοκιμές για την εκτίμηση της διαβρωτικότητας στο δέρμα *in vivo* (9)(10)(11): η δοκιμή σε μοντέλο ανθρώπινου δέρματος (η παρούσα μέθοδος) και η δοκιμή διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (βλέπε μέθοδο δοκιμών B.40α).

Από μελέτες επικύρωσης προκύπτει ότι οι δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιούνται μοντέλα ανθρώπινου δέρματος (3)(4)(5)(9) είναι ικανές να διακρίνουν με αξιοπιστία μεταξύ γνωστών διαβρωτικών και μη διαβρωτικών για το δέρμα ουσιών. Το πρωτόκολλο της δοκιμής μπορεί επίσης να παράσχει ενδείξεις διάκρισης μεταξύ ισχυρών και λιγότερο ισχυρών διαβρωτικών για το δέρμα ουσιών.

Η δοκιμή που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο επιτρέπει τον χαρακτηρισμό των διαβρωτικών χημικών ουσιών και μειγμάτων. Επιτρέπει, επίσης, τον χαρακτηρισμό των μη διαβρωτικών ουσιών και μειγμάτων, όταν υποστηρίζεται από προσδιορισμό του βάρους της μαρτυρίας με χρήση άλλων υφιστάμενων στοιχείων (π.χ. pH, σχέσεις δομής —δραστικότητας, ανθρώπινα και/ή ζωικά δεδομένα) (1)(2)(11)(14). Δεν παρέχει, κατά κανόνα, πληροφορίες για τον ερεθισμό του δέρματος ούτε επιτρέπει την κατάταξη των διαβρωτικών ουσιών σε υποκατηγορίες, όπως προβλέπει το Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης (GHS) (1).

Για πλήρη αξιολόγηση των τοπικών δερματικών επιδράσεων μετά από εφάπαξ δερματική έκθεση, συνιστάται η εφαρμογή της στρατηγικής διαδοχικών δοκιμών (ακολουθιακός έλεγχος) που προσαρτάται στη μέθοδο δοκιμών B.4 (2) και προβλέπεται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα (1). Η εν λόγω στρατηγική δοκιμών περιλαμβάνει την εκτέλεση δοκιμών *in vitro* για διάβρωση του δέρματος (όπως περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο) και δερματικό ερεθισμό, πριν εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμών σε ζωντανά ζώα.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Διάβρωση του δέρματος *in vivo*: η πρόκληση μη αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα, όπως: ορατή νέκρωση διαμέσου της επιδερμίδας και εντός του χορίου, μετά την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας για τέσσερις, κατά μέγιστο όριο, ώρες. Οι διαβρωτικές αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από έλκη, αιμορραγία, θρόμβους αίματος και, στο τέλος της δεκατετραήμερης παρακολούθησης, αποχρωματισμό, λόγω λεύκανσης του δέρματος, ολόκληρες περιοχές αλωπεκίας και ουλές. Για την αξιολόγηση των αμφισβητήσιμων αλλοιώσεων θα πρέπει να διερευνάται η δυνατότητα παθολογοανατομικής εξέτασης.

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού (π.χ. η ικανότητα των κυτταρικών μιτοχονδριακών αφυδρογονασών να ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT), η οποία, ανάλογα με το μετρούμενο τελικό σημείο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με τον συνολικό αριθμό και/ή την ζωτικότητα των κυττάρων.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Πίνακας 1:

Χημικές ουσίες αναφοράς

Ονομασία	Αριθ. EINECS	Αριθ. CAS	
1,2-Διαμινοπροπάνιο	201-155-9	78-90-0	Ισχυρό διαβρωτικό
Ακρυλικό οξύ	201-177-9	79-10-7	Ισχυρό διαβρωτικό
2-τριτ.-Βουτυλοφαινόλη	201-807-2	88-18-6	Διαβρωτικό
Υδροξείδιο του καλίου (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Διαβρωτικό
Θειικό οξύ (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Διαβρωτικό
Οκτανικό οξύ (καπρυλικό οξύ)	204-677-5	124-07-02	Διαβρωτικό
4-Αμινο-1,2,4-τριαζόλιο	209-533-5	584-13-4	Δεν προκαλεί διάβρωση
Ευγενόλη	202-589-1	97-53-0	Δεν προκαλεί διάβρωση
Φαιναιθυλοβρωμίδιο	203-130-8	103-63-9	Δεν προκαλεί διάβρωση
Τετραχλωροαιθυλένιο	204-825-9	27-18-4	Δεν προκαλεί διάβρωση
Ισοστεατικό οξύ	250-178-0	30399-84-9	Δεν προκαλεί διάβρωση
4-(Μεθυλοθειο)-βενζαλδεΰδη	222-365-7	3446-89-7	Δεν προκαλεί διάβρωση

Οι περισσότερες από τις χημικές ουσίες του ανωτέρω πίνακα έχουν ληφθεί από τον κατάλογο των χημικών ουσιών που επιλέχθηκαν στο πλαίσιο της διεθνούς μελέτης επικύρωσης, του Ευρωπαϊκού Κέντρου Επικύρωσης Εναλλακτικών Μεθόδων — (ECVAM) (4). Η επιλογή τους βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια:

(i) ίσος αριθμός διαβρωτικών και μη διαβρωτικών ουσιών,

(ii) ουσίες του εμπορίου που καλύπτουν τις περισσότερες από τις εν προκειμένω σημαντικές κατηγορίες χημικών προϊόντων,

(iii) συνεκτίμηση ισχυρών και λιγότερο ισχυρών διαβρωτικών ουσιών, ώστε να είναι δυνατή η διάκριση βάσει της διαβρωτικής ισχύος,

▼B

(iv) επιλογή χημικών ουσιών που μπορούν να αποτελέσουν το αντικείμενο εργαστηριακών χειρισμών χωρίς να δημιουργούν άλλους, σοβαρούς κινδύνους πέραν της διαβρωτικότητας.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Το ελεγχόμενο υλικό εφαρμόζεται τοπικά σε τρισδιάστατο μοντέλο του ανθρώπινου δέρματος, το οποίο περιλαμβάνει τουλάχιστον επιδερμίδα από ανασύσταση, με λειτουργική κερατίνη στιβάδα. Τα διαβρωτικά υλικά αναγνωρίζονται από την ικανότητά τους να προκαλούν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας [όπως προσδιορίζεται, λόγου χάριν, με χρήση της δοκιμής αναγωγής MTT (15)] κάτω από καθορισμένα επίπεδα κατωφλίου σε καθορισμένες περιόδους έκθεσης. Η αρχή της δοκιμής σε μοντέλο ανθρώπινου δέρματος βασίζεται στην παραδοχή ότι οι διαβρωτικές χημικές ουσίες είναι ικανές να διαπερνούν την κερατίνη στιβάδα με διάχυση ή διάβρωση και είναι κυτταροτοξικές για τις υποκείμενες κυτταρικές στιβάδες.

1.4.1. **Διαδικασία**

1.4.1.1. *Μοντέλα ανθρώπινου δέρματος*

Τα μοντέλα ανθρώπινου δέρματος μπορούν να κατασκευαστούν ή να ληφθούν από το εμπόριο (π.χ. μοντέλα EpiDerm™ και EPISKIN™) (16)(17)(18)(19) ή να αναπτυχθούν/κατασκευαστούν στο εργαστήριο που εκτελεί τη δοκιμή (20)(21). Αναγνωρίζεται ότι η χρήση ανθρώπινου δέρματος υπόκειται σε εθνικούς και διεθνείς κανόνες και όρους δεοντολογίας. Κάθε νέο μοντέλο πρέπει να επικυρώνεται (τουλάχιστον στο βαθμό που περιγράφεται στο σημείο 1.4.1.1.2). Τα μοντέλα ανθρώπινου δέρματος που χρησιμοποιούνται για την παρούσα δοκιμή πρέπει να πληρούν τους ακόλουθους όρους:

1.4.1.1.1 Γενικοί όροι για το μοντέλο:

Πρέπει να χρησιμοποιούνται ανθρώπινα κερατινοκύτταρα για την κατασκευή του επιθηλίου. Πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές στιβάδες βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων κάτω από μία λειτουργική κερατίνη στιβάδα. Το δερματικό μοντέλο πρέπει, επίσης, να διαθέτει μία στρωματική συστατική στιβάδα. Η κερατίνη στιβάδα πρέπει να είναι πολυστρωματική και να διαθέτει τα αναγκαία λιπιδικά χαρακτηριστικά, ώστε να δημιουργεί ισχυρό λειτουργικό φράγμα, ανθεκτικό στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών δεικτών. Οι ιδιότητες συγκράτησης του μοντέλου πρέπει να αποτρέπουν την παράκαμψη της κερατίνης στιβάδας από υλικά και την είσοδό τους στον βιώσιμο ιστό. Η παράκαμψη της κερατίνης στιβάδας από τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες οδηγεί σε μη ικανοποιητική μοντελοποίηση της δερματικής έκθεσης. Το μοντέλο δέρματος πρέπει να μην έχει μολυνθεί με βακτηρίδια (συμπεριλαμβανομένου του μυκοπλάσματος) ή μύκητες.

1.4.1.1.2 Όροι για τη λειτουργία του μοντέλου:

Το μέγεθος της βιωσιμότητας συνήθως προσδιορίζεται ποσοτικά με τη χρήση MTT ή άλλων χρωστικών ζωτικής χρώσης που υφίστανται μεταβολική μετατροπή. Στις περιπτώσεις αυτές, η οπτική πυκνότητα (OD) της χρωστικής που εκχυλίζεται (διαλύεται) από τον ιστό αρνητικό μάρτυρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 20πλάσια της OD του ίδιου του εκχυλιστικού διαλύτη [για επισκόπηση, βλ. (22)]. Ο ιστός αρνητικός μάρτυρας πρέπει να είναι σταθερός σε καλλιέργεια (να παρέχει παρόμοιες μετρήσεις βιωσιμότητας) για τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης που προβλέπεται στη δοκιμή. Η κερατίνη στιβάδα πρέπει να είναι αρκούντως ισχυρή, ώστε να ανθίσταται στην ταχεία διείσδυση ορισμένων κυτταροτοξικών χημικών ουσιών δεικτών (π.χ. 1 % Triton X-100). Η ιδιότητα αυτή μπορεί να εκτιμηθεί από τον χρόνο έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % (ET_{50}) (π.χ. για τα μοντέλα EpiDerm™ και EPISKIN™ ο χρόνος αυτός είναι μεγαλύτερος από 2 ώρες). Ο ιστός πρέπει να εμφανίζει επαναληπτικότητα στον χρόνο και, κατά προτίμηση, διεργαστηριακή επαναληπτικότητα. Επιπλέον, πρέπει να είναι ικανός να παρέχει πρόγνωση του διαβρωτικού δυναμικού των χημικών ουσιών αναφοράς (βλέπε πίνακα 1), όταν χρησιμοποιείται στο επιλεγμένο πρωτόκολλο δοκιμής.

▼B

1.4.1.2. *Εφαρμογή των ελεγχόμενων ουσιών και των ουσιών μαρτύρων*

Χρησιμοποιείται διπλό δείγμα ιστού για κάθε αγωγή (χρόνος έκθεσης), συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων. Προκειμένου περί υγρών υλικών, πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας ώστε να καλύπτει ομοιόμορφα τη δερματική επιφάνεια: πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 25ml/-cm^2. Στην περίπτωση των στερεών υλικών, πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας, ώστε να καλύπτει ομοιόμορφα το δέρμα, και να υγραίνεται με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό, ώστε να εξασφαλίζεται ικανοποιητική επαφή με το δέρμα. Όπου ενδείκνυται, τα στερεά πρέπει να κονιοποιούνται πριν από την εφαρμογή. Η μέθοδος εφαρμογής πρέπει να είναι κατάλληλη για την ελεγχόμενη ουσία (βλέπε π.χ. βιβλιογραφική παραπομπή 5). Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, το ελεγχόμενο υλικό πρέπει να εκπλύνεται προσεκτικά από τη δερματική επιφάνεια με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ή με διάλυμα NaCl 0,9 %.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για κάθε μελέτη, ώστε να εξασφαλίζονται ικανοποιητικές επιδόσεις του πειραματικού μοντέλου. Οι υποδεικνυόμενες ως θετικοί μάρτυρες ουσίες είναι το παγόμορφο οξικό οξύ ή διάλυμα KOH 8N. Ως αρνητικοί μάρτυρες προτείνονται το διάλυμα NaCl 0,9 % ή το νερό.

1.4.1.3. *Μετρήσεις κυτταρικής βιωσιμότητας*

Μόνον ποσοτικές, επικυρωμένες μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Επιπλέον, η μέτρηση της βιωσιμότητας πρέπει να είναι συμβατή με τη χρήση σε τρισδιάστατο ιστολογικό μόρφωμα. Η μη ειδική δέσμευση της χρωστικής πρέπει να μην επηρεάζει τη μέτρηση της βιωσιμότητας. Οι χρωστικές που δεσμεύουν πρωτεΐνες, καθώς και εκείνες που δεν υφίστανται μεταβολική μετατροπή (π.χ. ερυθρά χρωστική Neutral Red) είναι, ως εκ τούτου, ακατάλληλες. Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη δοκιμασία είναι η αναγωγή του MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, μπλε του θειαζολυλίου: αριθ. EINECS 206-069-5, αριθ. CAS 298-93-1] που έχει αποδειχθεί ότι εξασφαλίζει ακριβή και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα (5), πλην όμως επιτρέπεται η χρήση και άλλων. Το δερματικό δείγμα φέρεται σε διάλυμα MTT κατάλληλης συγκέντρωσης (π.χ. 0,3-1 mg/ml), σε κατάλληλη θερμοκρασία επωάσης, επί τρίωρο. Το σχηματιζόμενο μπλε ίζημα φορμαζάνης εκχυλίζεται με διαλύτη (ισοπροπανόλη) και μετράται η συγκέντρωση της φορμαζάνης με προσδιορισμό της OD σε μήκος κύματος μεταξύ 540 και 595 nm.

Η χημική δράση του ελεγχόμενου υλικού στη χρωστική ζωτικής χρώσης μπορεί να μιμείται αυτήν του κυτταρικού μεταβολισμού, με αποτέλεσμα την εσφαλμένη εκτίμηση της βιωσιμότητας. Αυτό έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει όταν το ελεγχόμενο υλικό δεν έχει απομακρυνθεί εντελώς από το δέρμα με έκπλυση (9). Σε περίπτωση που το ελεγχόμενο υλικό δρα απευθείας στη χρωστική ζωτικής χρώσης, πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετοι μάρτυρες για την ανίχνευση και διόρθωση της παρέμβασης των ελεγχόμενων ουσιών στη μέτρηση της βιωσιμότητας (9)(23).

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Για κάθε ιστό, πρέπει να αναφέρονται, σε μορφή πίνακα, οι τιμές OD και το υπολογιζόμενο επί τοις εκατό ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας, για το ελεγχόμενο υλικό και τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες, συμπεριλαμβανομένων των δεδομένων από τις πολλαπλές/επαναληπτικές δοκιμές, με μέσες και μεμονωμένες τιμές.

▼B

2.1. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι τιμές OD που προκύπτουν για κάθε δοκίμιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό ενός επί τοις εκατό ποσοστού βιωσιμότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος καθορίζεται αυθαίρετα σε 100 %. Η εκατοστιαία διαχωριστική τιμή (τιμή αποκοπής/cut-off value) κυτταρικής βιωσιμότητας, η οποία αποτελεί το μέτρο διάκρισης μεταξύ διαβρωτικών και μη διαβρωτικών ελεγχόμενων υλικών (ή μεταξύ διαφορετικών κατηγοριών διαβρωτικών ουσιών), ή η (οι) στατιστική(-ές) διαδικασία(-ες) που χρησιμοποιείται(-ούνται) για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τον χαρακτηρισμό των διαβρωτικών υλικών, πρέπει να ορίζεται(-ονται) επακριβώς και να τεκμηριώνεται(-ονται) και να καταδεικνύεται η καταλληλότητά της (τους). Γενικά, οι εν λόγω διαχωριστικές τιμές καθορίζονται κατά τη βελτιστοποίηση της δοκιμής, ελέγχονται κατά τη διάρκεια μιας προεπικυρωτικής φάσης και επιβεβαιώνονται σε μελέτη επικύρωσης. Για παράδειγμα, η πρόγνωση διαβρωτικότητας που συνδέεται με το μοντέλο EpiDerm^{TM} έχει ως εξής (9):

Η ελεγχόμενη ουσία θεωρείται ως διαβρωτική για το δέρμα, εάν:

(i) η βιωσιμότητα μετά από τρίλεπτη έκθεση είναι μικρότερη του 50 % ή

(ii) η βιωσιμότητα μετά από τρίλεπτη έκθεση είναι ίση με 50 % ή μεγαλύτερη και η βιωσιμότητα μετά από έκθεση μίας ώρας είναι μικρότερη του 15 %.

Η ελεγχόμενη ουσία θεωρείται ως μη διαβρωτική για το δέρμα, εάν:

(i) η βιωσιμότητα μετά από τρίλεπτη έκθεση είναι ίση με 50 % ή μεγαλύτερη και η βιωσιμότητα μετά από έκθεση μίας ώρας είναι ίση με 15 % ή μεγαλύτερη.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία και μάρτυρες:

— χημική(-ές) ονομασία(-ες), όπως κατά IUPAC ή ονομασία CAS και αριθμός CAS, εφόσον είναι γνωστά,

— καθαρότητα και σύνθεση της ουσίας ή του παρασκευάσματος [σε επί τοις εκατό ποσοστό(-ά) κατά βάρος],

— φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως φυσική κατάσταση, pH, σταθερότητα, υδατοδιαλυτότητα, που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,

— κατεργασία των ελεγχόμενων ουσιών/μαρτύρων πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

— σταθερότητα, εφόσον είναι γνωστή.

Αιτιολόγηση του δερματικού μοντέλου και του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκαν.

Συνθήκες δοκιμής:

— χρησιμοποιηθέν κυτταρικό σύστημα,

— στοιχεία βαθμονόμησης της συσκευής μετρήσεων που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας (π.χ. φασματοφωτόμετρο),

▼B

— πλήρη στοιχεία τεκμηρίωσης για το συγκεκριμένο μοντέλο δέρματος που χρησιμοποιήθηκε, συμπεριλαμβανομένης της εγκυρότητάς του,

— λεπτομέρειες για την εφαρμοσθείσα διαδικασία δοκιμών,

— χρησιμοποιηθείσες δόσεις δοκιμής,

— περιγραφή των ενδεχόμενων τροποποιήσεων της διαδικασίας της δοκιμής,

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το μοντέλο,

— περιγραφή των εφαρμοσθέντων κριτηρίων αξιολόγησης.

Αποτελέσματα:

— δεδομένα από τα επιμέρους δοκίμια σε μορφή πίνακα,

— περιγραφή άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Συμπέρασμα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2. Μέθοδος δοκιμών B.4. Οξεία τοξικότητα: ερεθισμός/διάβρωση του δέρματος.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23,219-255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. *In Vitro* 12, 471-482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. *In Vitro* 12, 483-524.

6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

9. Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp.371-401.

10. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

11. ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365-67.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In Vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

13. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st –2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

15. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, 55-63.

16. Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. *In Vitro* 8, 889-891.

17. Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211-225.

18. Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis *in vitro*. In *In vitro* Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133-140

19. Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). *In vitro* and post –transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193: 310-319

20. Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163-171.

21. Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747-756.

▼B

22. Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 69-84.

23. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. InVItro 15, 57-93.

▼B

B.41. **ΔΟΚΙΜΗ ΦΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 3T3 NRU *IN VITRO***

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών TG 432 (2004) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως φωτοτοξικότητα ορίζεται η τοξική απόκριση που προκαλείται από την εφαρμογή ουσίας στο σώμα και εμφανίζεται ή εντείνεται (ορατή σε χαμηλότερες δόσεις) μετά την εν συνεχεία έκθεση στο φως ή που επάγεται από ακτινοβόληση του δέρματος κατόπιν συστηματικής χορήγησης μιας ουσίας.

Η δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του φωτοτοξικού δυναμικού ελεγχόμενης χημικής ουσίας, το οποίο επάγεται από τη διέγερσή της μετά την έκθεση στο φως. Με τη δοκιμή αυτή αξιολογείται η φωτοκυτταροτοξικότητα με βάση τη σχετική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων που εκτίθενται στη χημική ουσία παρουσία και απουσία φωτός. Οι χαρακτηριζόμενες με την παρούσα δοκιμή ουσίες ενδέχεται να είναι φωτοτοξικές *in vivo* μετά από συστηματική εφαρμογή και κατανομή στο δέρμα ή μετά από τοπική εφαρμογή.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι χημικών ουσιών που έχουν αναφερθεί ως φωτοτοξικές (1)(2)(3)(4). Το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να απορροφούν φωτεινή ενέργεια στη περιοχή μηκών κύματος του ηλιακού φωτός. Σύμφωνα με τον πρώτο νόμο της φωτοχημείας (νόμος Grotthaus-Draper), η φωτοαντίδραση απαιτεί επαρκή απορρόφηση κβάντων φωτός. Συνεπώς, πριν εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής βιολογικής δοκιμής, πρέπει να προσδιορίζεται το φάσμα απορρόφησης υπεριώδους/ορατού της ελεγχόμενης ουσίας σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή TG 101 του ΟΟΣΑ. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι εάν η μοριακή απορροφητικότητα είναι μικρότερη από 10 λίτρα × mol-1 × cm-1, η χημική ουσία δεν είναι πιθανό να είναι φωτοδραστική. Μια τέτοια ουσία μπορεί να μη χρειάζεται να υποβληθεί στη δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* ή σε άλλη βιολογική δοκιμή για τον προσδιορισμό δυσμενών φωτοχημικών επιδράσεων (1)(5). Βλέπε επίσης παράρτημα 1.

Η αξιοπιστία και η καταλληλότητα της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* αξιολογήθηκαν πρόσφατα (6)(7)(8)(9). Καταδείχθηκε ότι με τη δοκιμή αυτή επιτυγχάνεται πρόγνωση επιδράσεων οξείας φωτοτοξικότητας σε ζώα και στον άνθρωπο *in vivo*. Η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για την πρόγνωση άλλων δυσμενών επιδράσεων που μπορεί να προκύψουν από τη συνδυασμένη δράση χημικής ουσίας και φωτός, π.χ. δεν καλύπτει τη φωτογονιδιοτοξικότητα, τη φωτοαλλεργία ή τη φωτοκαρκινογένεση ούτε επιτρέπει την εκτίμηση της φωτοτοξικής ισχύος. Εξάλλου, η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για την εξέταση των έμμεσων μηχανισμών φωτοτοξικότητας, της επίδρασης των μεταβολιτών της ελεγχόμενης ουσίας ή της επίδρασης μιγμάτων.

Αν και η χρήση μεταβολικών συστημάτων αποτελεί γενική απαίτηση για όλες τις δοκιμές *in vitro* για την πρόγνωση του γονιδιοτοξικού και καρκινογόνου δυναμικού, μέχρι σήμερα, στην περίπτωση της φωτοτοξικολογίας, υπάρχουν ελάχιστα παραδείγματα όπου χρειάζεται μεταβολικός μετασχηματισμός για να δράσει η ουσία ως φωτοτοξίνη *in vivo* ή *in vitro*. Δεν θεωρείται επομένως αναγκαία ούτε δικαιολογείται επιστημονικά η εκτέλεση της παρούσας δοκιμής με σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Ένταση ακτινοβολίας: η ένταση του προσπίπτοντος σε μια επιφάνεια υπεριώδους (UV) ή ορατού φωτός, μετρούμενη σε W/m^2 ή mW/cm^2.

Δόση φωτός: η ποσότητα (= ένταση × χρόνος) της προσπίπτουσας σε μια επιφάνεια υπεριώδους (UV) ή ορατής ακτινοβολίας, εκφραζόμενη σε Joule (= W × s) ανά μονάδα επιφανείας, π.χ. J/m^2 ή J/cm^2.

Ζώνες UV φωτός: οι χαρακτηρισμοί που συνιστά η διεθνής επιτροπή CIE (Commision Internationale de L'Eclairage) είναι: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) και UVC (100-280 nm). Χρησιμοποιούνται επίσης και άλλοι χαρακτηρισμοί: το όριο μεταξύ UVB και UVA τοποθετείται συχνά στα 320 nm, ενώ η UVA μπορεί να υποδιαιρείται σε UV-A1 και UV-A2, με όριο τα 340 nm περίπου.

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού (π.χ. πρόσληψη της ερυθράς χρωστικής ζωτικής χρώσης Neutral Red σε κυτταρικά λυσοσώματα), η οποία, ανάλογα με το μετρούμενο τελικό σημείο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με το συνολικό αριθμό ή/και τη ζωτικότητα των κυττάρων.

Σχετική κυτταρική βιωσιμότητα: η κυτταρική βιωσιμότητα εκφραζόμενη σε σχέση με διαλύτες μάρτυρες (αρνητικούς), οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε όλα τα στάδια της διαδικασίας δοκιμής (είτε +Irr είτε -Irr), όχι όμως σε αγωγή με την ελεγχόμενη χημική ουσία.

PIF (Photo-Irritation-Factor/συντελεστής φωτοερεθισμού): συντελεστής που λαμβάνεται με σύγκριση δύο εξίσου αποτελεσματικών κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων (IC_{50}) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, χωρίς (-Irr) και με (+Irr) μη κυτταροτοξική ακτινοβόληση με UVA/ορατό φως.

IC_{50}: η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που προκαλεί μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 50 %.

MPE (Mean-Photo-Effect/μέση φωτοεπίδραση): μέτρηση που προκύπτει από μαθηματική ανάλυση των καμπυλών συγκέντρωσης-απόκρισης οι οποίες λαμβάνονται χωρίς (-Irr) και με (+Irr) μη κυτταροτοξική ακτινοβόληση με UVA/ορατό φως.

Φωτοτοξικότητα: οξεία τοξική απόκριση, η οποία εμφανίζεται μετά την πρώτη έκθεση του δέρματος σε ορισμένες χημικές ουσίες και την εν συνεχεία έκθεση στο φως ή επάγεται, ομοίως, από ακτινοβόληση του δέρματος κατόπιν συστηματικής χορήγησης χημικής ουσίας.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* βασίζεται σε σύγκριση της κυτταροτοξικότητας χημικής ουσίας, όταν ελέγχεται με και χωρίς έκθεση σε μη κυτταροτοξική δόση προσομοιωμένου ηλιακού φωτός. Η κυτταροτοξικότητα στη δοκιμή αυτή εκφράζεται ως εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση μείωση της πρόσληψης της ερυθράς χρωστικής ζωτικής χρώσης Neutral Red (NR), μετρούμενη 24 ώρες μετά από αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία και ακτινοβόληση (10). Η NR είναι ασθενής, κατιονική χρωστική που διαπερνά εύκολα την κυτταρική μεμβράνη χωρίς διάχυση και συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά στα λυσοσώματα. Αλλοιώσεις της επιφάνειας της ευαίσθητης λυσοσωματικής μεμβράνης συνεπάγονται ευθραυστότητα των λυσοσωμάτων και άλλες αλλαγές που σταδιακά καθίστανται μη αναστρέψιμες. Οι αλλαγές αυτές, που οφείλονται στη δράση ξενοβιοτικών, έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσληψη και σύνδεση της NR. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να γίνει διάκριση μεταξύ κυττάρων που είναι βιώσιμα, έχουν υποστεί βλάβη ή είναι νεκρά, το οποίο αποτελεί και τη βάση της συγκεκριμένης δοκιμής.

▼B

Κύτταρα Balb/c 3T3 διατηρούνται σε καλλιέργεια επί 24 ώρες ώστε να σχηματιστούν μονοστιβάδες. Δύο τρυβλία 96 κοιλοτήτων ανά ελεγχόμενη χημική ουσία προεπωάζονται με οκτώ διαφορετικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας επί μία ώρα. Στη συνέχεια, ένα από τα δύο τρυβλία εκτίθεται στην υψηλότερη μη κυτταροτοξική δόση ακτινοβόλησης, ενώ το δεύτερο διατηρείται στο σκοτάδι. Και στα δύο τρυβλία, το υλικό αγωγής αντικαθίσταται κατόπιν από θρεπτικό υλικό και, έπειτα από 24 ακόμη ώρες επώασης, προσδιορίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα με πρόσληψη Neutral Red. Η κυτταρική βιωσιμότητα, εκφράζεται ως επί τοις εκατό ποσοστό των μη υποβληθέντων σε αγωγή διαλυτών μαρτύρων και υπολογίζεται για καθεμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής. Για την πρόγνωση του φωτοτοξικού δυναμικού, συγκρίνονται οι αποκρίσεις συναρτήσει της συγκέντρωσης που λαμβάνονται με και χωρίς ακτινοβόληση, συνήθως στο επίπεδο IC_{50}, δηλαδή της συγκέντρωσης που προκαλεί μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 50 % σε σύγκριση με τους μη υποβληθέντες σε αγωγή μάρτυρες.

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Παρασκευάσματα**

1.4.1.1 *Κύτταρα*

Στη μελέτη επικύρωσης χρησιμοποιήθηκε η μόνιμη κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικού Balb/c 3T3, κλώνος 31, προερχόμενη είτε από την American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, είτε από την European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, και ως εκ τούτου, συνιστάται η προμήθεια αυτής της κυτταρικής σειράς από καταξιωμένες συλλογές κυττάρων. Στην ίδια διαδικασία δοκιμής μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα κύτταρα ή κυτταρικές σειρές, εφόσον οι συνθήκες καλλιέργειας είναι προσαρμοσμένες στις ειδικές ανάγκες των κυττάρων, πρέπει όμως να καταδεικνύεται η ισοδυναμία.

Τα κύτταρα θα πρέπει να ελέγχονται τακτικά για να εξακριβώνεται ότι δεν έχουν μολυνθεί από μυκόπλασμα και να χρησιμοποιούνται μόνον εφόσον το αποτέλεσμα του ελέγχου είναι αρνητικό (11).

Έχει ιδιαίτερη σημασία να ελέγχεται τακτικά η ευαισθησία των κυττάρων στο UV σύμφωνα με τη διαδικασία ποιοτικού ελέγχου που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο. Επειδή η ευαισθησία των κυττάρων στο UVA μπορεί να αυξάνεται με τον αριθμό των ανακαλλιεργειών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κύτταρα Balb/c 3T3 με τον χαμηλότερο δυνατό αριθμό ανακαλλιεργειών, κατά προτίμηση κάτω των 100 (βλέπε σημείο 1.4.2.2.2 και παράρτημα 2).

1.4.1.2. *Θρεπτικά υλικά και συνθήκες καλλιέργειας*

Για τη συνήθη καλλιέργεια κυττάρων και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα θρεπτικά υλικά και συνθήκες επώασης, π.χ. προκειμένου για κύτταρα Balb/c 3T3, το υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) με προσθήκη ορού νεογέννητου μοσχαριού 10 %, γλουταμίνης 4 mM, πενικιλίνης (100 IU) και στρεπτομυκίνης (100 mg/ml) και επώαση με υγρασία στους 37 °C, 5-7,5 % CO_2 ανάλογα με το ρυθμιστικό διάλυμα (βλέπε σημείο 1.4.1.4, δεύτερο εδάφιο). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να εξασφαλίζουν οι συνθήκες της κυτταρικής καλλιέργειας ότι ο χρόνος κυτταρικού κύκλου περιλαμβάνεται στα κανονικά ιστορικά πλαίσια των χρησιμοποιούμενων κυττάρων ή κυτταρικών σειρών.

1.4.1.3 *Παρασκευή των καλλιεργειών*

Κύτταρα από κατεψυγμένες αρχικές καλλιέργειες εμβολιάζονται σε θρεπτικό υλικό σε κατάλληλη πυκνότητα και ανακαλλιεργούνται τουλάχιστον μία φορά, πριν χρησιμοποιηθούν στην δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro*.

▼B

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή φωτοτοξικότητας εμβολιάζονται σε θρεπτικό υλικό σε πυκνότητα τέτοια ώστε οι καλλιέργειες να μη φθάνουν σε κατάσταση συρροής μέχρι το τέλος της δοκιμής, δηλαδή όταν προσδιορίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα, 48 ώρες μετά τον εμβολιασμό των κυττάρων. Στην περίπτωση των κυττάρων Balb/c 3T3 που καλλιεργούνται σε τρυβλία 96 κοιλοτήτων, η συνιστώμενη κυτταρική πυκνότητα εμβολιασμού είναι 1×10^4 κύτταρα ανά κοιλότητα.

Για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία, τα κύτταρα εμβολιάζονται με τον ίδιο τρόπο σε δύο χωριστά τρυβλία 96 κοιλοτήτων, τα οποία υποβάλλονται κατόπιν, ταυτόχρονα, στην πλήρη διαδικασία της δοκιμής υπό πανομοιότυπες συνθήκες καλλιέργειας, εκτός από το χρονικό διάστημα κατά το οποίο το ένα από τα τρυβλία ακτινοβολείται (+Irr) και το άλλο διατηρείται στο σκοτάδι (-Irr).

1.4.1.4 *Παρασκευή της ελεγχόμενης ουσίας*

Οι ελεγχόμενες ουσίες πρέπει να παρασκευάζονται αμέσως πριν από τη χρήση τους, εκτός εάν τα υπάρχοντα δεδομένα καταδεικνύουν ότι παραμένουν σταθερές κατά την αποθήκευση. Συνιστάται να εκτελούνται όλοι οι χειρισμοί των χημικών ουσιών και η αρχική κατεργασία των κυττάρων υπό συνθήκες φωτισμού που δεν επιτρέπουν τη φωτοενεργοποίηση ή αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας πριν από την ακτινοβόλησή της.

Οι ελεγχόμενες ουσίες διαλύονται σε ρυθμιστικά διαλύματα αλάτων, π.χ. Earl's Balanced Salt Solution (EBSS), ή σε άλλα φυσιολογικά ρυθμιστικά διαλύματα, τα οποία, προς αποφυγή παρεμβολών κατά την ακτινοβόληση, πρέπει να είναι απαλλαγμένα πρωτεϊνικών συστατικών και συστατικών που απορροφούν το φως (π.χ. χρωστικές δείκτες του pH και βιταμίνες). Δεδομένου ότι κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης τα κύτταρα παραμένουν έξω από τον επωαστήρα CO_2 επί 50 λεπτά περίπου, πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή αλκαλοποίησης. Σε περίπτωση χρησιμοποίησης ασθενών ρυθμιστικών διαλυμάτων, όπως το EBSS, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με επώαση των κυττάρων σε 7,5 % CO_2. Εφόσον τα κύτταρα επωάζονται σε 5 % CO_2 μόνο, θα πρέπει να επιλέγεται ισχυρότερο ρυθμιστικό διάλυμα.

Οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες που είναι δυσδιάλυτες στο νερό θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλο διαλύτη. Εφόσον χρησιμοποιείται διαλύτης, ο όγκος του πρέπει να είναι σταθερός σε όλες τις καλλιέργειες, δηλαδή τόσο στους αρνητικούς μάρτυρες (διαλύτες), όσο και σε όλες τις συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, και η συγκέντρωσή του να μην είναι κυτταροτοξική. Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να μην προκύπτουν ιζηματούχα ή θολά διαλύματα.

Ως διαλύτες συνιστώνται το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και η αιθανόλη. Κατάλληλοι μπορεί να είναι και άλλοι διαλύτες χαμηλής κυτταροτοξικότητας. Πριν από τη χρήση των διαλυτών, πρέπει να αξιολογούνται συγκεκριμένες ιδιότητές τους, π.χ. αντίδραση με την ελεγχόμενη ουσία, εξασθένηση της φωτοτοξικής επίδρασης, δέσμευση ελευθέρων ριζών ή/και χημική σταθερότητα της ουσίας στον διαλύτη.

Η διαλυτοποίηση είναι δυνατόν να διευκολύνεται με ανάδευση (vortex) ή/και επίδραση υπερήχων ή/και θέρμανση σε κατάλληλη θερμοκρασία, εφόσον δεν επηρεάζεται η σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας.

▼B

1.4.1.5 *Συνθήκες ακτινοβόλησης*

1.4.1.5.1 Φωτεινή πηγή

Η επιλογή κατάλληλης φωτεινής πηγής και κατάλληλων φίλτρων αποτελεί κρίσιμο παράγοντα της δοκιμής φωτοτοξικότητας. Το φως στις περιοχές της ακτινοβολίας UVA και της ορατής συνδέεται συνήθως με φωτοτοξικές αντιδράσεις *in vivo* (3)(12), ενώ η UVB, που γενικά είναι λιγότερο σημαντική ως προς τη φωτοτοξικότητα, παρουσιάζει υψηλή κυτταροτοξικότητα, η οποία χιλιαπλασιάζεται, καθώς το μήκος κύματος μειώνεται από 313 σε 280 nm (13). Στα κριτήρια επιλογής κατάλληλης φωτεινής πηγής πρέπει να περιλαμβάνεται η απαίτηση να εκπέμπει σε μήκη κύματος που απορροφούνται από την ελεγχόμενη ουσία (φάσμα απορρόφησης), ενώ η δόση φωτός (εφικτή μέσα σε εύλογο χρονικό διάστημα έκθεσης) θα πρέπει να είναι επαρκής για την ανίχνευση γνωστών φωτοκυτταροτοξικών χημικών ουσιών. Επιπλέον, τα χρησιμοποιούμενα μήκη κύματος και δόσεις δεν θα πρέπει να είναι αδικαιολόγητα επιβλαβή για το σύστημα δοκιμής, π.χ. με την εκπομπή θερμότητας (περιοχή υπερύθρου).

Ως βέλτιστη τεχνητή φωτεινή πηγή θεωρείται η προσομοίωση του ηλιακού φωτός με ηλιακούς προσομοιωτές. Η κατανομή της ισχύος ακτινοβόλησης του εφοδιασμένου με φίλτρα ηλιακού προσωμοιωτή θα πρέπει να είναι παραπλήσια εκείνης του φωτός της ημέρας σε εξωτερικούς χώρους, που παρατίθεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (14). Ως ηλιακοί προσομοιωτές χρησιμοποιούνται τόσο τόξα ξένου όσο και (εμπλουτισμένα) τόξα υδραργύρου-αλογονιδίου μετάλλου. Τα τελευταία παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι εκπέμπουν λιγότερη θερμότητα και είναι φθηνότερα, αλλά η απομίμηση του ηλιακού φωτός είναι ατελέστερη σε σύγκριση με τα τόξα ξένου. Δεδομένου ότι όλοι οι ηλιακοί προσομοιωτές εκπέμπουν σημαντικές ποσότητες UVB, θα πρέπει να είναι εφοδιασμένοι με κατάλληλα φίλτρα, ώστε να εξασθενεί η υψηλής κυτταροτοξικότητας ακτινοβολία UVB. Επειδή τα πλαστικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας περιέχουν σταθεροποιητές UV, το φάσμα θα πρέπει να μετράται διαμέσου καλύμματος τρυβλίου 96 κοιλοτήτων του ιδίου τύπου με εκείνο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία. Ανεξαρτήτως των μέτρων που λαμβάνονται για την εξασθένηση τμημάτων του φάσματος, είτε με χρήση φίλτρων είτε μέσω του αναπόφευκτου φιλτραρίσματος από τον εξοπλισμό, το φάσμα που καταγράφεται κάτω από τα φίλτρα αυτά δεν θα πρέπει να αποκλίνει από το τυποποιημένο φως της ημέρας σε εξωτερικούς χώρους (14). Παράδειγμα της κατανομής της φασματικής έντασης ακτινοβολίας του εφοδιασμένου με φίλτρα ηλιακού προσομοιωτή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro*, παρέχεται στις βιβλιογραφικές παραπομπές (8) και (16). Βλέπε επίσης παράρτημα 2 σχήμα 1.

1.4.1.5.2 Δοσιμετρία

Η ένταση του φωτός (ένταση ακτινοβολίας) θα πρέπει να ελέγχεται τακτικά πριν από κάθε δοκιμή φωτοτοξικότητας, με τη βοήθεια κατάλληλου ευρυζωνικού μετρητή ακτινοβολίας UV. Η ένταση θα πρέπει να μετράται διαμέσου καλύμματος τρυβλίου 96 κοιλοτήτων του ιδίου τύπου με εκείνο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία. Ο μετρητής ακτινοβολίας UV πρέπει να βαθμονομείται ως προς την πηγή. Οι επιδόσεις του θα πρέπει να ελέγχονται και, για το σκοπό αυτό, συνιστάται η χρήση ενός δεύτερου μετρητή UV αναφοράς του ίδιου τύπου και με την ίδια ακριβώς βαθμονόμηση. Θεωρητικά, κατά μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, θα πρέπει να χρησιμοποιείται φασματοραδιόμετρο για τη μέτρηση της φασματικής έντασης της ακτινοβολίας της εφοδιασμένης με φίλτρα φωτεινής πηγής και για τον έλεγχο της βαθμονόμησης του ευρυζωνικού μετρητή UV.

Προσδιορίστηκε ότι δόση 5 J/cm^2 (μετρούμενη στην περιοχή UVA) δεν είναι κυτταροτοξική για τα κύτταρα Balb/c 3T3, είναι όμως επαρκής για τη διέγερση χημικών ουσιών ώστε να προκαλέσουν εμφανείς φωτοτοξικές επιδράσεις (6) (17)· π.χ. για την επίτευξη 5 J/cm^2 εντός χρονικού διαστήματος 50 λεπτών, η ένταση της ακτινοβολίας ρυθμίστηκε στα 1,7 mW/cm^2. Βλέπε παράρτημα 2 σχήμα 2. Εάν χρησιμοποιηθεί άλλη κυτταρική σειρά ή διαφορετική φωτεινή πηγή, η δόση ακτινοβόλησης ενδέχεται να πρέπει να ρυθμιστεί κατά τρόπο ώστε να είναι δυνατόν να επιλεγούν επίπεδα δόσης αβλαβή για τα κύτταρα, αλλά επαρκή για τη διέγερση συνήθων φωτοτοξινών. Ο χρόνος έκθεσης στο φως υπολογίζεται ως εξής:

▼B

$$\text{t(min)} = \frac{\text{δόση ακτινοβόλησης}(J/cm^2) \times 1000}{\text{ένταση ακτινοβολίας}(mW/cm^2) \times 60} \quad (1\ \text{J} = 1\ \text{Wsec})$$

1.4.2 **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1 *Συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας*

Το εύρος των συγκεντρώσεων μιας χημικής ουσίας που υποβάλλεται σε δοκιμή παρουσία (+Irr) και απουσία (-Irr) φωτός θα πρέπει να προσδιορίζεται κατάλληλα με πειράματα εύρεσης του πεδίου τιμών δόσης. Μπορεί να είναι χρήσιμο να εκτιμηθεί η διαλυτότητα στην αρχή και στα 60 λεπτά (ή σε όποιο χρόνο αγωγής πρόκειται να χρησιμοποιηθεί), δεδομένου ότι είναι δυνατόν να μεταβληθεί με την πάροδο του χρόνου ή κατά τη διάρκεια της έκθεσης. Για να αποφευχθεί η επαγωγή τοξικότητας από ακατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας ή από πολύ όξινες ή αλκαλικές χημικές ουσίες, το pH των κυτταρικών καλλιεργειών στις οποίες έχει προστεθεί η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6,5 και 7,8.

Η υψηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας θα πρέπει να βρίσκεται εντός των ορίων των φυσιολογικών συνθηκών δοκιμής — θα πρέπει να αποφεύγονται, λόγου χάριν, δυσμενείς συνθήκες οσμωτικής πίεσης ή pH. Ανάλογα με την ελεγχόμενη ουσία, ενδέχεται να χρειαστεί να συνεκτιμηθούν άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες ως παράγοντες που περιορίζουν την υψηλότερη συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας. Για σχετικά αδιάλυτες ουσίες, οι οποίες δεν είναι τοξικές σε συγκεντρώσεις που φθάνουν το σημείο κορεσμού, η δοκιμή θα πρέπει να διενεργείται με την υψηλότερη εφικτή συγκέντρωση. Θα πρέπει γενικά να αποφεύγεται η καθίζηση της ελεγχόμενης ουσίας σε οιαδήποτε από τις ελεγχόμενες συγκεντρώσεις. Η μέγιστη συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 1 000 mg/ml, ενώ η ωσμωτικότητα δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 10 mmolar. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται γεωμετρική σειρά αραιώσεων 8 συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας με σταθερό συντελεστή αραίωσης (βλέπε σημείο 2.1, δεύτερο εδάφιο).

Εάν υπάρχουν στοιχεία (από πείραμα εύρεσης πεδίου τιμών) σύμφωνα με τα οποία η ελεγχόμενη ουσία δεν είναι κυτταροτοξική μέχρι την οριακή συγκέντρωση στο πείραμα που εκτελείται στο σκοτάδι (-Irr), αλλά είναι πολύ κυτταροτοξική όταν ακτινοβοληθεί (+Irr), το εύρος συγκεντρώσεων που θα επιλεγεί για το πείραμα (+Irr) μπορεί να είναι διαφορετικό από εκείνο που θα επιλεγεί για το πείραμα (–Irr), προκειμένου να τηρηθεί η απαίτηση επαρκούς ποιότητας των δεδομένων.

1.4.2.2 *Μάρτυρες*

1.4.2.2.1 Ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοβολία, συγκέντρωση ιστορικών στοιχείων:

Η ευαισθησία των κυττάρων στην φωτεινή πηγή θα πρέπει να ελέγχεται τακτικά (σε κάθε πέμπτη ανακαλλιέργεια περίπου) με εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους μετά από έκθεση σε αυξανόμενες δόσεις ακτινοβολίας. Στην εκτίμηση αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται διάφορες δόσεις ακτινοβόλησης, συμπεριλαμβανομένων δόσεων σημαντικά υψηλότερων από εκείνες που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU. Ο ευκολότερος τρόπος ποσοτικού προσδιορισμού των δόσεων αυτών είναι η μέτρηση της υπεριώδους ακτινοβολίας της φωτεινής πηγής. Τα κύτταρα εμβολιάζονται στην πυκνότητα που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* και ακτινοβολούνται την επόμενη ημέρα. Η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίζεται μία ημέρα αργότερα με πρόσληψη χρωστικής Neutral Red. Θα πρέπει να καταδεικνύεται ότι η προκύπτουσα υψηλότερη μη κυτταροτοξική δόση (π.χ. στη μελέτη επικύρωσης: 5 J/cm^2 [UVA]) ήταν επαρκής για την ορθή ταξινόμηση των χημικών ουσιών αναφοράς (πίνακας 1).

▼B

1.4.2.2.2 Ευαισθησία στην ακτινοβολία, έλεγχος της τρέχουσας δοκιμής:

Η δοκιμή πληροί τα ποιοτικά κριτήρια, εάν οι ακτινοβολημένοι αρνητικοί μάρτυρες/διαλύτες, εμφανίζουν βιωσιμότητα μεγαλύτερη από 80 % σε σχέση με τον μη ακτινοβολημένο αρνητικό μάρτυρα/διαλύτη.

1.4.2.2.3 Βιωσιμότητα των διαλυτών μαρτύρων:

Η απόλυτη οπτική πυκνότητα ($OD_{540\ NRU}$) της Neutral Red που εκχυλίζεται από τους διαλύτες μάρτυρες δηλώνει κατά πόσον τα εμβολιασθέντα 1×10^4 κύτταρα ανά κοιλότητα αναπτύχθηκαν με κανονικό χρόνο διπλασιασμού κατά τη διήμερη διάρκεια της δοκιμασίας. Η δοκιμή πληροί τα κριτήρια αποδοχής εάν η μέση $OD_{540\ NRU}$ των μη υποβληθέντων σε αγωγή μαρτύρων είναι ίση με 0,4 ή μεγαλύτερη (δηλαδή περίπου εικοσαπλάσια της απορροφητικότητας υποβάθρου του διαλύτη).

1.4.2.2.4 Θετικός μάρτυρας:

Σε κάθε δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro* πρέπει να ελέγχεται συγχρόνως και μια γνωστή φωτοτοξική χημική ουσία. Συνιστάται η χλωροπρομαζίνη (CPZ). Για τον έλεγχο της CPZ με το τυποποιημένο πρωτόκολλο της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro*, ορίστηκαν τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής: CPZ ακτινοβολημένη (+Irr): IC_{50} = 0,1 έως 2,0 mg/ml, CPZ μη ακτινοβολημένη (-Irr): IC_{50} = 7,0 έως 90,0 mg/ml. Ο συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF) θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος του 6. Οι ιστορικές επιδόσεις του θετικού μάρτυρα θα πρέπει να παρακολουθούνται.

Αντί της χλωροπρομαζίνης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συγχρονικοί θετικοί μάρτυρες άλλες φωτοτοξικές χημικές ουσίες κατάλληλες για τη χημική κατηγορία ή τα χαρακτηριστικά διαλυτότητας της αξιολογούμενης ουσίας.

1.4.3 **Διαδικασία δοκιμής (6)(7)(8)(16)(17):**

1.4.3.1 *1η ημέρα:*

Φέρονται 100 mg θρεπτικού υλικού στις περιφερειακές κοιλότητες ενός μικροτιτλοδοτικού τρυβλίου ιστοκαλλιέργειας 96 κοιλοτήτων (= τυφλός προσδιορισμός). Στις εναπομένουσες κοιλότητες, φέρονται 100 ml κυτταρικού εναιωρήματος με 1×10^5 κύτταρα/ml (= 1×10^4 κύτταρα/κοιλότητα). Ετοιμάζονται δύο τρυβλία για κάθε σειρά συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας, καθώς και για τους μάρτυρες με διαλύτη και τους θετικούς μάρτυρες.

Τα κύτταρα επωάζονται επί 24 ώρες (βλέπε σημείο 1.4.1.2) έως ότου σχηματίσουν μονοστιβάδα σε επίπεδα ημισυρροής. Αυτή η περίοδος επώασης επιτρέπει την επαναφορά των κυττάρων σε κανονική κατάσταση, την πρόσφυση και τη λογαριθμική τους ανάπτυξη.

1.4.3.2 *2η ημέρα:*

Μετά την επώαση, αποχύνεται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα εκπλύνονται προσεκτικά με 150 ml του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την επώαση. Προστίθενται 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος με την κατάλληλη συγκέντρωση ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή διαλύτη (διαλύτης μάρτυρας). Χρησιμοποιούνται 8 διαφορετικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Τα κύτταρα επωάζονται με την ελεγχόμενη ουσία στο σκοτάδι επί 60 λεπτά (βλέπε σημείο 1.4.1.2 και σημείο 1.4.1.4 δεύτερο εδάφιο).

Από τα δύο τρυβλία που ετοιμάστηκαν για κάθε σειρά συγκεντρώσεων ελεγχόμενης ουσίας και για τους μάρτυρες, επιλέγεται ένα, συνήθως τυχαία, για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας (-Irr) (τρυβλίο μάρτυρας) και ένα (τρυβλίο αγωγής) για τον προσδιορισμό της φωτοκυτταροτοξικότητας (+Irr).

▼B

Για την έκθεση +Irr, τα κύτταρα ακτινοβολούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επί 50 λεπτά διαμέσου του καλύμματος του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων με την υψηλότερη δόση ακτινοβολίας που δεν είναι κυτταροτοξική (βλέπε επίσης παράρτημα 2). Τα μη ακτινοβολημένα τρυβλία (-Irr) διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέσα σε σκοτεινό κουτί επί 50 λεπτά (= χρόνος έκθεσης στο φως).

Το ελεγχόμενο διάλυμα αποχύνεται και ακολουθεί διπλή προσεκτική έκπλυση με 150 ml του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την επώαση, το οποίο όμως δεν περιέχει την ελεγχόμενη ουσία. Το ρυθμιστικό διάλυμα αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό και ακολουθεί επώαση (βλέπε σημείο 1.4.1.2) όλη τη νύκτα (18-22 ώρες).

1.4.3.3 *3η ημέρα:*

1.4.3.3.1 Μικροσκοπική αξιολόγηση

Εξετάζονται η ανάπτυξη και η μορφολογία των κυττάρων, καθώς και η ακεραιότητα της μονοστιβάδας με μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων. Καταγράφονται οι αλλαγές στη μορφολογία και οι επιδράσεις στην ανάπτυξη των κυττάρων.

1.4.3.3.2 Δοκιμή πρόσληψης Neutral Red

Τα κύτταρα εκπλύνονται με 150 ml προθερμασμένου ρυθμιστικού διαλύματος. Το διάλυμα έκπλυσης απομακρύνεται με ήπια άντληση. Προστίθενται 100 ml διαλύματος Neutral Red (NR) (υδροχλωρική 3-αμινο-7-διμεθυλαμινο-2-μεθυλοφαιναζίνη, αριθ. EINECS 209-035-8, αριθ. CAS 553-24-2, C.I. 50040) 50 μg/mL σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (16) και ακολουθεί επώαση επί 3 ώρες, όπως περιγράφεται στο σημείο 1.4.1.2.

Μετά την επώαση, απομακρύνεται το υλικό NR και τα κύτταρα εκπλύνονται με 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολουθεί απόχυση και απομάκρυνση της περίσσειας ρυθμιστικού διαλύματος με στύπωση ή φυγοκέντρηση.

Προστίθενται ακριβώς 150 ml διαλύματος εκρόφησης NR (έχει παρασκευαστεί πρόσφατα με 49 μέρη νερού + 50 μέρη αιθανόλης + 1 μέρος οξικού οξέος).

Το μικροτιτλοδοτικό τρυβλίο ανακινείται ήπια με τη βοήθεια συσκευής ανακίνησης μικροτιτλοδοτικών τρυβλίων επί 10 λεπτά, μέχρις ότου εκχυλιστεί η NR από τα κύτταρα και σχηματιστεί ομοιογενές διάλυμα.

Μετράται η οπτική πυκνότητα του εκχυλίσματος NR στα 540 nm με φασματοφωτόμετρο, χρησιμοποιώντας την ένδειξη του τυφλού προσδιορισμού ως σημείο αναφοράς. Τα δεδομένα αποθηκεύονται σε κατάλληλα ηλεκτρονικά αρχεία για μεταγενέστερη ανάλυση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα δεδομένα της δοκιμής θα πρέπει να επιτρέπουν την ουσιαστική ανάλυση της σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης με και χωρίς ακτινοβόληση και, εάν είναι δυνατόν, της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας που προκαλεί μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 50 % (IC_{50}). Εφόσον διαπιστωθεί κυτταροτοξικότητα, τόσο το εύρος των συγκεντρώσεων όσο και το μεταξύ των επιμέρους συγκεντρώσεων διάστημα θα πρέπει να ρυθμίζονται κατά τρόπο ώστε να μπορεί να χαραχθεί καμπύλη προσαρμοσμένη στα πειραματικά δεδομένα.

Σε περίπτωση σαφώς θετικών ή σαφώς αρνητικών αποτελεσμάτων (βλέπε σημείο 2.3, πρώτο εδάφιο), ενδέχεται να αρκεί το αρχικό πείραμα, υποστηριζόμενο από ένα ή περισσότερα προκαταρκτικά πειράματα εύρεσης πεδίου τιμών δόσης.

▼B

Τα διφορούμενα, οριακά ή ασαφή αποτελέσματα πρέπει να αποσαφηνίζονται με τη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών (βλέπε επίσης σημείο 2.4 δεύτερο εδάφιο). Στις περιπτώσεις αυτές θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο μεταβολής των πειραματικών συνθηκών. Μεταξύ των πειραματικών συνθηκών που μπορούν να μεταβληθούν αναφέρονται το εύρος των συγκεντρώσεων, τα μεταξύ των διαδοχικών συγκεντρώσεων διαστήματα, ο χρόνος προεπώασης και ο χρόνος ακτινοβόλησης-έκθεσης. Στην περίπτωση των ασταθών στο νερό χημικών ουσιών μπορεί να ενδείκνυται μικρότερος χρόνος έκθεσης.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η αξιολόγηση των δεδομένων μπορεί να βασιστεί στον υπολογισμό του συντελεστή φωτοερεθισμού (PIF) ή της μέσης φωτοεπίδρασης (MPE).

Για τον υπολογισμό των μέτρων φωτοκυτταροτοξικότητας (βλέπε κατωτέρω) η σειρά των διακριτών τιμών συγκέντρωσης-απόκρισης πρέπει να προκύψει κατά προσέγγιση από κατάλληλη συνεχή καμπύλη δόσης-απόκρισης (μοντέλο). Η καμπύλη προσαρμόζεται συνήθως στα δεδομένα με μέθοδο μη γραμμικής παλινδρόμησης (18). Για την εκτίμηση της επίδρασης της διακύμανσης των δεδομένων στην προσαρμοσμένη καμπύλη, συνιστάται η εφαρμογή της μεθόδου εύρεσης εκτιμητριών bootstrap.

Ο συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF) υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Εάν δεν μπορεί να υπολογιστεί η IC_{50} παρουσία ή απουσία φωτός, δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί PIF για το ελεγχόμενο υλικό.

Η μέση φωτοεπίδραση (MPE) βασίζεται σε σύγκριση των πλήρων καμπυλών συγκέντρωσης-απόκρισης (19) και ορίζεται ως ο σταθμισμένος μέσος όρος αντιπροσωπευτικής σειράς τιμών φωτοεπίδρασης

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Η φωτοεπίδραση PE_c σε κάθε συγκέντρωση C ορίζεται ως το γινόμενο της επίδρασης της απόκρισης RE_c επί την επίδραση της δόσης DE_c, δηλαδή $PE_c = RE_c \times DE_c$. Η επίδραση της απόκρισης RE_c είναι η διαφορά μεταξύ των παρατηρούμενων αποκρίσεων απουσία και παρουσία φωτός, δηλαδή $RE_c = R_c$ (-Irr) - R_c (+Irr). Η επίδραση της δόσης δίδεται από τον τύπο

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

όπου C* αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ισοδυναμίας, δηλαδή τη συγκέντρωση στην οποία η απόκριση +Irr ταυτίζεται με την απόκριση –Irr σε συγκέντρωση C. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η C*, επειδή οι τιμές απόκρισης της καμπύλης +Irr είναι συστηματικά υψηλότερες ή χαμηλότερες από την RC(-Irr), η επίδραση της δόσης ορίζεται σε 1. Οι συντελεστές στάθμισης w_i δίδονται από την υψηλότερη τιμή απόκρισης, δηλαδή w_i = MAX {Ri (+Irr), Ri (-Irr) }. Ο κάναβος συγκεντρώσεων C_i επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να περικλείεται ο ίδιος αριθμός σημείων σε καθένα από τα διαστήματα συγκέντρωσης που ορίζονται από τις τιμές συγκέντρωσης οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Ο υπολογισμός της MPE περιορίζεται στη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης, στην οποία μία τουλάχιστον από τις δύο καμπύλες εξακολουθεί να εμφανίζει τιμή απόκρισης τουλάχιστον 10 %. Εάν η μέγιστη αυτή συγκέντρωση υπερβαίνει την υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα +Irr, το υπόλοιπο τμήμα της καμπύλης +Irr ορίζεται στην τιμή απόκρισης «0». Η χημική ουσία ταξινομείται ως φωτοτοξική αναλόγως του εάν η τιμή MPE είναι ή όχι υψηλότερη από μία καταλλήλως επιλεγμένη διαχωριστική τιμή (τιμή αποκοπής/cut-off value) MPE_c = 0,15.

▼B

Για τον υπολογισμό των PIF και MPE διατίθεται σχετικό λογισμικό (20).

2.3. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Με βάση τη μελέτη επικύρωσης (8), η πρόγνωση για ελεγχόμενη ουσία με PIF < 2 ή MPE < 0,1 είναι «απουσία φωτοτοξικότητας». Μια τιμή PIF > 2 και < 5 ή MPE > 0,1 και < 0,15 συνεπάγεται «πιθανή φωτοτοξικότητα», ενώ τιμή PIF > 5 ή MPE > 0,15 συνεπάγεται «φωτοτοξικότητα».

Τα εργαστήρια που εκτελούν για πρώτη φορά την εν λόγω δοκιμασία οφείλουν να ελέγξουν τις ουσίες αναφοράς που παρατίθενται στον πίνακα 1, πριν υποβάλουν τις ελεγχόμενες ουσίες σε δοκιμή φωτοτοξικότητας. Οι τιμές PIF ή MPE πρέπει να είναι παραπλήσιες εκείνων που αναγράφονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Χημική ονομασία	Αριθ. EINECS	Αριθ. CAS	PIF	MPE	κορυφή απορρόφησης	Διαλύτης [1]
Υδροχλωρική αμιοδαρόνη	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (ώμος)	αιθανόλη
Υδροχλωρική χλωροπρομαζίνη	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	αιθανόλη
Νορφλοξακίνη	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	ακετονιτρίλιο
Ανθρακένιο	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19-0,81	356 nm	ακετονιτρίλιο
Πρωτοπορφυρίνη IX, άλας με νάτριο	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	αιθανόλη
L-ιστιδίνη		[7006-35-1]	απουσία PIF	0,05-0,10	211 nm	νερό
Εξαχλωροφαίνιο	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (ώμος)	αιθανόλη
Λαυρυλοθειικό νάτριο	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	απουσία απορρόφησης	νερό

[1] Διαλύτης χρησιμοποιούμενος για τη μέτρηση της απορρόφησης.

2.4. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Εάν παρατηρούνται φωτοτοξικές επιδράσεις μόνο στην υψηλότερη ελεγχόμενη συγκέντρωση (ιδίως προσκειμένου για υδατοδιαλυτές ελεγχόμενες ουσίες) μπορεί να χρειαστεί να ληφθούν υπόψη πρόσθετες παράμετροι για την εκτίμηση του κινδύνου. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται δεδομένα για την απορρόφηση από το δέρμα και τη συσσώρευση της χημικής ουσίας στο δέρμα και/ή δεδομένα από άλλες δοκιμές, π.χ. δοκιμές *in vitro* σε δέρμα ζώων ή ανθρώπου ή μοντέλα δέρματος.

▼B

Εφόσον δεν καταδειχθεί τοξικότητα (+Irr και -Irr) και εάν, λόγω μικρής διαλυτότητας, οι συγκεντρώσεις που μπορούσαν να ελεγχθούν ήταν περιορισμένες, ενδέχεται να αμφισβητηθεί η καταλληλότητα της δοκιμασίας για την ελεγχόμενη ουσία. Στην περίπτωση αυτή, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής επιβεβαιωτικής δοκιμής, π.χ. με χρήση άλλου μοντέλου.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— στοιχεία ταυτοποίησης, κοινόχρηστες ονομασίες, ονομασία κατά IUPAC και αριθ. CAS, εφόσον είναι γνωστά,

— φυσική μορφή και καθαρότητα,

— φυσικοχημικές ιδιότητες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,

— φάσμα απορρόφησης υπεριώδους/ορατού,

— σταθερότητα και φωτοσταθερότητα, εάν είναι γνωστές.

Διαλύτης:

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη,

— διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας στον διαλύτη,

— εκατοστιαία αναλογία του διαλύτη στο υλικό αγωγής.

Κύτταρα:

— τύπος και προέλευση των κυττάρων

— απουσία μυκοπλάσματος,

— αριθμός κυτταρικών ανακαλλιεργειών, εάν είναι γνωστός,

— ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοβολία, προσδιοριζόμενη με τον εξοπλισμό ακτινοβόλησης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU *in vitro*.

Συνθήκες δοκιμής (1)· *επώαση πριν και μετά την αγωγή*:

— τύπος και σύνθεση του θρεπτικού υλικού,

— συνθήκες επώασης (συγκέντρωση CO_2, θερμοκρασία, υγρασία),

— διάρκεια της επώασης (πριν και μετά την αγωγή).

Συνθήκες δοκιμής (2)· *αγωγή με τη χημική ουσία*:

— σκεπτικό της επιλογής των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν με και χωρίς ακτινοβόληση,

— σε περίπτωση δυσδιάλυτης ελεγχόμενης ουσίας και απουσίας κυτταροτοξικότητας, σκεπτικό της επιλογής της υψηλότερης συγκέντρωσης που ελέγχθηκε,

— τύπος και σύνθεση του υλικού αγωγής (ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων),

— διάρκεια της αγωγής με τη χημική ουσία.

Συνθήκες δοκιμής (3)· *ακτινοβόληση*:

— σκεπτικό της επιλογής της χρησιμοποιηθείσας φωτεινής πηγής,

▼B

— κατασκευαστής και τύπος της φωτεινής πηγής και του ραδιομέτρου

— χαρακτηριστικά της φασματικής έντασης ακτινοβολίας της φωτεινής πηγής,

— χαρακτηριστικά διαπερατότητας και απορρόφησης του ή των χρησιμοποιηθέντων φίλτρων,

— χαρακτηριστικά του ραδιομέτρου και λεπτομέρειες της βαθμονόμησής του,

— απόσταση της φωτεινής πηγής από το σύστημα δοκιμής,

— ένταση της ακτινοβολίας UVA στην απόσταση αυτή, εκφραζόμενη σε mW/cm^2,

— διάρκεια της έκθεσης σε υπεριώδες/ορατό φως,

— δόση UVA (ένταση ακτινοβολίας x χρόνος), εκφραζόμενη σε J/cm^2,

— θερμοκρασία των κυτταρικών καλλιεργειών κατά την ακτινοβόληση και των κυτταρικών καλλιεργειών που διατηρήθηκαν, ταυτόχρονα, στο σκοτάδι.

Συνθήκες δοκιμής (4)· *δοκιμή βιωσιμότητας με Neutral Red*:

— σύνθεση του υλικού αγωγής με Neutral Red,

— διάρκεια επώασης με Neutral Red,

— συνθήκες επώασης (συγκέντρωση CO_2, θερμοκρασία, υγρασία),

— συνθήκες εκχύλισης της Neutral Red (εκχυλιστικό μέσο, διάρκεια),

— μήκος κύματος που χρησιμοποιήθηκε για τη φασματοφωτομετρική μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της Neutral Red,

— δεύτερο μήκος κύματος (αναφοράς), εφόσον χρησιμοποιήθηκε,

— περιεχόμενο του τυφλού δείγματος του φασματοφωτομέτρου, εφόσον χρησιμοποιήθηκε.

Αποτελέσματα:

— κυτταρική βιωσιμότητα σε κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, εκφραζόμενη σε επί τοις εκατό ποσοστό της μέσης βιωσιμότητας των συγχρονικών διαλυτών μαρτύρων,

— καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης (συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας σε συνάρτηση με τη σχετική κυτταρική βιωσιμότητα), λαμβανόμενες σε ταυτόχρονα πειράματα +Irr και -Irr,

— ανάλυση των καμπυλών συγκέντρωσης — απόκρισης: εφόσον είναι δυνατόν, υπολογισμός με/χωρίς υπολογιστή των τιμών IC_{50} (+Irr) και IC_{50} (-Irr),

— σύγκριση των δύο καμπυλών συγκέντρωσης — απόκρισης που λαμβάνονται με και χωρίς ακτινοβόληση, είτε με υπολογισμό του συντελεστή φωτοερεθισμού (PIF) είτε με υπολογισμό της μέσης φωτοεπίδρασης (MPE),

— κριτήρια αποδοχής της δοκιμής· συγχρονικός μάρτυρας-διαλύτης:

— απόλυτη βιωσιμότητα (οπτική πυκνότητα του εκχυλίσματος Neutral Red) ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων κυττάρων,

— ιστορικά στοιχεία για τον αρνητικό μάρτυρα-διαλύτη· μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις.

— κριτήρια αποδοχής της δοκιμής· συγχρονικός θετικός μάρτυρας:

▼B

— IC_{50}(+Irr) και IC_{50}(-Irr) και PIF/MPE της χημικής ουσίας-θετικού μάρτυρα,

— ιστορικά στοιχεία για τη χημική ουσία-θετικό μάρτυρα: IC_{50}(+Irr) και IC_{50}(-Irr) και PIF/MPE· μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. *In Vitro* 7: 95-102.

2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In «Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry» Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.

4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In «The science of Photobiology» Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.

5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 «Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water» Environment Directorate, OECD, Paris.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. *In Vitro* 8, 793-796.

7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7-8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. *In Vitro* 12, 305-327.

9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119-124.

11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

▼B

12. Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In «Dermatotoxicology», edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515-530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

14. ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

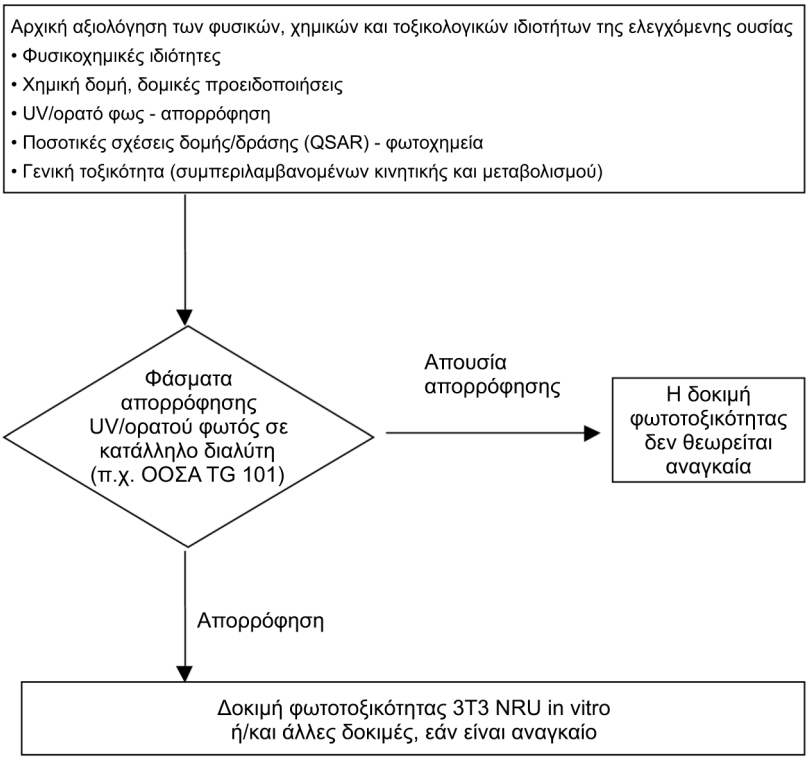
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_234-9687_1_1_1_1,00.html

▼B

Παραρτημα 1

Ρόλος της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 NRU σε μια προσέγγιση διαδοχικών δοκιμών (ακολουθιακός έλεγχος) φωτοτοξικότητας των χημικών ουσιών

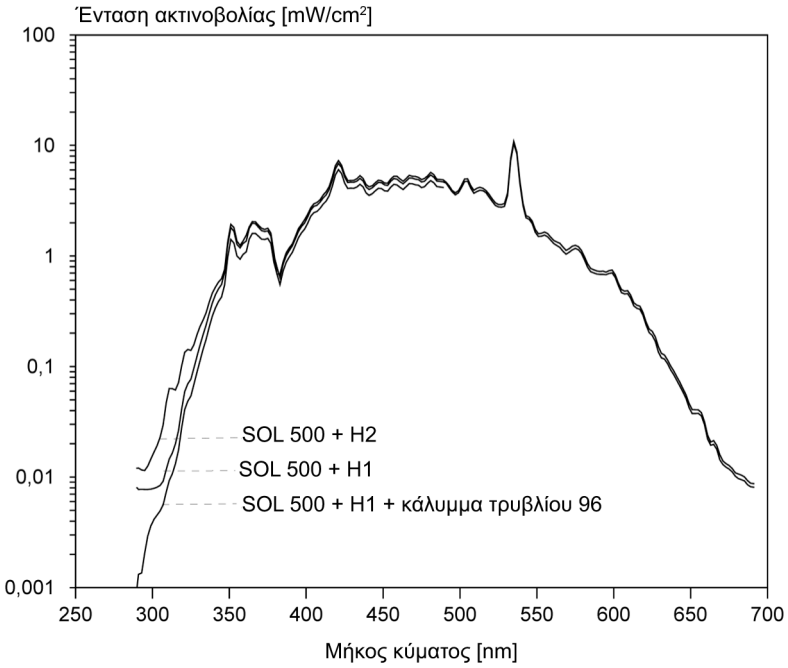


▼B

Παραρτημα 2

Σχήμα 1

Κατανομή της φασματικής έντασης της ακτινοβολίας ηλιακού προσομοιωτή εφοδιασμένου με φίλτρα



(Βλέπε σημείο 1.4.1.5 δεύτερο εδάφιο.)

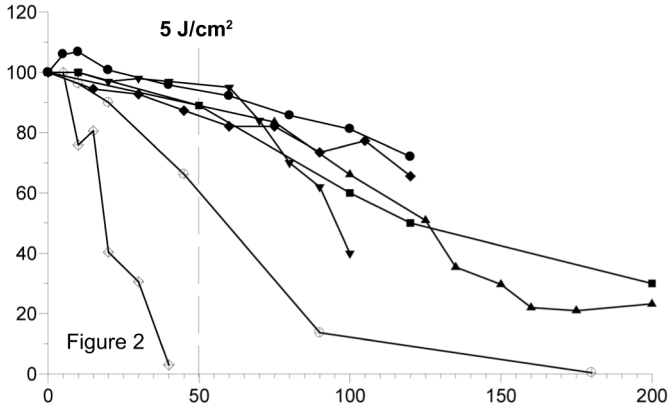
Στο σχήμα 1 παρέχεται παράδειγμα αποδεκτής κατανομής της φασματικής έντασης της ακτινοβολίας ηλιακού προσωμοιωτή εφοδιασμένου με φίλτρα, η οποία ελήφθη από την εμπλουτισμένη πηγή αλογονιδίου μετάλλου που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 XRU (6)(8)(17). Παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της χρήσης δύο διαφορετικών φίλτρων και το επιπλέον φιλτράρισμα από το κάλυμμα τρυβλίου 96 κοιλοτήτων. Το φίλτρο H2 χρησιμοποιήθηκε μόνο με συστήματα δοκιμής που ανέχονται υψηλότερες δόσεις UVB (δοκιμή με μοντέλο δέρματος και δοκιμή φωτοαιμόλυσης ερυθρών αιμοσφαιρίων). Στη δοκιμή φωτοτοξικότητας 3T3 NRU χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο H1. Από το σχήμα προκύπτει ότι το επιπλέον φιλτράρισμα από το κάλυμμα του τρυβλίου παρατηρείται κυρίως στην περιοχή UVB, απομένει ωστόσο επαρκής UVB στο φάσμα ακτινοβόλησης για τη διέγερση χημικών ουσιών που απορροφούν κατά κανόνα στην περιοχή UVB, όπως η αμιοδαρόνη (βλέπε πίνακα 1).

▼B

Σχήμα 2

Ευαισθησία των κυττάρων Balb/c 3T3 στην ακτινοβόληση (μετρούμενη στην περιοχή UVA)

Κυτταρική βιωσιμότητα (% πρόσληψη Neutral Red από μάρτυρες στο σκοτάδι)



(Βλέπε σημεία 1.4.1.5.2 δεύτερο εδάφιο, 1.4.2.2.1 και 1.4.2.2.2.)

Ευαισθησία των κυττάρων Balb/c 3T3 στην ακτινοβόληση με τον ηλιακό προσομοιωτή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3NRU, μετρούμενη στην περιοχή UVA. Στο σχήμα εμφαίνονται τα αποτελέσματα της μελέτης προεπικύρωσης σε 7 διαφορετικά εργαστήρια (1). Ενώ οι δύο καμπύλες με τα λεπτά σύμβολα ελήφθησαν με κύτταρα μεγάλης ηλικίας (μεγάλος αριθμός ανακαλλιεργειών), τα οποία χρειάστηκε να αντικατασταθούν με νέες κυτταρικές καλλιέργειες, οι καμπύλες με τα έντονα σύμβολα δείχνουν κύτταρα με αποδεκτή ανοχή ακτινοβολίας.

Με βάση τα στοιχεία αυτά προσδιορίστηκε η υψηλότερη μη κυτταροτοξική δόση ακτινοβόλησης των 5 J/cm^2 (κατακόρυφη διακεκομμένη γραμμή). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή δείχνει επιπλέον τη μέγιστη αποδεκτή επίδραση της ακτινοβόλησης που παρατίθεται στο σημείο 1.4.2.2.

▼M3

Β.42. ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες και οι μέθοδοι δοκιμών της ΕΕ που βασίζονται στις εν λόγω κατευθυντήριες γραμμές επανεξετάζονται κατά περιόδους με βάση την επιστημονική πρόοδο, τις μεταβαλλόμενες ανάγκες κανονιστικής ρύθμισης και τον προβληματισμό όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων. Στο παρελθόν θεσπίστηκε η αρχική μέθοδος δοκιμών για τον προσδιορισμό της δερματικής ευαισθητοποίησης σε ποντικούς, δηλαδή η τοπική δοκιμασία λεμφαδένων (LLNA — OECD Test Guideline 429, κεφάλαιο Β.42 του παρόντος παραρτήματος) (1). Έχουν δημοσιευθεί λεπτομερείς περιγραφές της επικύρωσης της LLNA, καθώς και επισκόπηση των σχετικών εργασιών (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Η επικαιροποιημένη LLNA βασίζεται στην αξιολόγηση της αποκτηθείσας πείρας και των επιστημονικών δεδομένων (12). Πρόκειται για μια δεύτερη μέθοδο δοκιμών που σχεδιάστηκε για την εκτίμηση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) στα ζώα. Η άλλη μέθοδος δοκιμών (δηλαδή η «OECD Test Guideline 406», κεφάλαιο Β.6 του παρόντος παραρτήματος) συνίσταται σε δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια, συγκεκριμένα στη δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια και τη δοκιμή Buehler (13). Η LLNA προσφέρει πλεονεκτήματα έναντι της μεθόδου Β.6 και της κατευθυντήριας γραμμής «OECD Test Guideline 406» (13) από πλευράς καλής μεταχείρισης των ζώων. Η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών LLNA περιλαμβάνει μια σειρά από πρότυπα επιδόσεων (προσάρτημα 1) τα οποία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της κατάστασης επικύρωσης νέων και/ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών που είναι λειτουργικά και μηχανιστικά παρεμφερείς με την LLNA, σύμφωνα με το καθοδηγητικό έγγραφο «OECD Guidance Document No. 34» του ΟΟΣΑ (14).

2. Η LLNA μελετά το επαγωγικό στάδιο της δερματικής ευαισθητοποίησης και παρέχει κατάλληλα ποσοτικά δεδομένα για την εκτίμηση της σχέσης δόσης-απόκρισης. Επισημαίνεται ότι οι ασθενείς/μέτριες ευαισθητοποιητικές ουσίες που συνιστάται να χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες στις μεθόδους δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (δηλαδή στις μεθόδους Β.6, OECD Test Guideline 406) (13) είναι κατάλληλες και για την LLNA (6) (8) (15). Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται επίσης, ως εναλλακτική επιλογή, μια προσέγγιση περιορισμένης LLNA (reduced LLNA/rLLNA) με την οποία είναι δυνατόν να μειωθεί ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων ζώων έως και κατά 40 % (16) (17) (18). Η rLLNA μπορεί να χρησιμοποιείται όταν χρειάζεται να επιβεβαιωθεί, για ρυθμιστικούς λόγους, μια αρνητική πρόγνωση δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης, υπό τον όρο ότι τηρούνται όλες οι υπόλοιπες προδιαγραφές του πρωτοκόλλου της LLNA, όπως περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Η πρόγνωση αρνητικού αποτελέσματος θα πρέπει να βασίζεται σε όλα τα διαθέσιμα στοιχεία, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4. Για την εφαρμογή της προσέγγισης rLLNA θα πρέπει να προβάλλονται σαφείς λόγοι και επιστημονική αιτιολόγηση. Εάν, παρά τις προβλέψεις, προκύψει θετικό ή αμφίβολο αποτέλεσμα από την rLLNA, ενδέχεται να χρειαστούν πρόσθετες δοκιμές για την ερμηνεία ή τη διασαφήνιση των ευρημάτων. Η rLLNA δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ελεγχόμενων ουσιών, όταν χρειάζονται στοιχεία σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης, λόγου χάριν για την κατάταξη σε υποκατηγορίες στο πλαίσιο του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων και του Παγκοσμίως Εναρμονισμένου Συστήματος Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Προϊόντων (GHS).

ΟΡΙΣΜΟΙ

3. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 2.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η LLNA παρέχει μια εναλλακτική μέθοδο αναγνώρισης χημικών προϊόντων που πιθανώς προκαλούν δερματική ευαισθητοποίηση. Αυτό δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι η LLNA πρέπει να χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση αντί των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδοι Β.6, OECD Test Guideline 406) (13), αλλά μάλλον ότι είναι εφάμιλλη των τελευταίων και μπορεί να χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση, η οποία κατά κανόνα δεν απαιτεί περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, θετικών και αρνητικών. Πριν

▼M3

από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να εξετάζει όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών τοξικότητας της ουσίας, in vitro ή in vivo, και τα τοξικολογικά δεδομένα που αφορούν χημικά προϊόντα ανάλογης δομής. Τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη προκειμένου να κριθεί αν η LLNA είναι κατάλληλη για την ουσία (με δεδομένη την ασυμβατότητα περιορισμένου αριθμού ειδών χημικών προϊόντων με την LLNA —βλέπε παράγραφο 5) και ως βοήθημα κατά την επιλογή δόσεων.

5. Η LLNA είναι μέθοδος in vivo και, επομένως, δεν καταργεί τη χρήση ζώων στην εκτίμηση της δραστικότητας αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Είναι ωστόσο ικανή να περιορίσει τον αριθμό των ζώων που απαιτούνται για τον σκοπό αυτό. Επιπλέον, βελτιώνει ουσιαστικά (ελάττωση του πόνου και της δυσφορίας) τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται τα ζώα στις δοκιμές αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Η LLNA βασίζεται στην εξέταση των ανοσολογικών συμβάντων που προκαλούν τα χημικά προϊόντα κατά το επαγωγικό στάδιο της ευαισθητοποίησης. Σε αντίθεση με τις δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδοι B.6, OECD Test Guideline 406) (13), η LLNA δεν απαιτεί την εκδήλωση των επαγόμενων από το ερέθισμα αντιδράσεων δερματικής υπερευαισθησίας. Επιπροσθέτως, δεν απαιτεί τη χρήση ανοσοενισχυτικών, όπως η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια (13). Κατ' αυτόν τον τρόπο, η LLNA περιορίζει τους πόνους και τη δυσφορία των ζώων. Παρά τα πλεονεκτήματά της έναντι των μεθόδων B.6 και OECD Test Guideline 406, πρέπει να αναγνωριστεί ότι υπάρχουν ορισμένοι περιοριστικοί παράγοντες που ενδέχεται να επιβάλλουν τη χρήση των B.6 και OECD Test Guideline 406 (13) (π.χ., ψευδαρνητικά ευρήματα κατά την LLNA με ορισμένα μέταλλα, ψευδοθετικά ευρήματα με ορισμένες ερεθιστικές για το δέρμα ουσίες [όπως ορισμένα επιφανειοδραστικά χημικά προϊόντα] (19) (20) ή η διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας). Επιπροσθέτως, η χρήση των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδοι B.6, OECD Test Guideline 406) (13) ενδέχεται να καταστεί αναγκαία στην περίπτωση χημικών ουσιών ή τάξεων χημικών ουσιών που περιέχουν δραστικές ομάδες οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν συγχυτικούς παράγοντες (21). Επίσης, αν ληφθεί υπόψη η περιορισμένη βάση δεδομένων επικύρωσης, η οποία περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο σκευάσματα φυτοφαρμάκων, είναι πιθανότερο να προκύψει θετικό αποτέλεσμα για τα συγκεκριμένα είδη ελεγχόμενων ουσιών με την LLNA απ' ό,τι με τη δοκιμή σε ινδικά χοιρίδια (22). Ωστόσο, κατά τη διεξαγωγή δοκιμών με σκευάσματα, είναι δυνατόν να εξετάζεται το ενδεχόμενο συμπερίληψης ομοειδών ουσιών με γνωστά αποτελέσματα ως ουσιών συγκριτικής αξιολόγησης, ώστε να καταδεικνύεται η ορθή λειτουργία της LLNA (βλέπε παράγραφο 16). Εκτός αυτών των εντοπισθέντων περιορισμών, θεωρείται ότι η LLNA μπορεί να εφαρμοστεί στις δοκιμές οποιασδήποτε ουσίας, εκτός εάν αυτή έχει ιδιότητες που ενδέχεται να επηρεάσουν την ορθότητα της μεθόδου.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

6. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η LLNA είναι ότι οι ευαισθητοποιητικές ουσίες επάγουν πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Ο πολλαπλασιασμός αυτός είναι ανάλογος με τη δόση και με την ισχύ του εφαρμοζόμενου αλλεργιογόνου και αποτελεί ένα απλό μέσο αντικειμενικής, ποσοτικής μέτρησης της ευαισθητοποίησης. Μετράται με σύγκριση του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα δοκιμής προς τον αριθμητικό μέσο του πολλαπλασιασμού στην ομάδα-μάρτυρα που έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον φορέα (VC). Προσδιορίζεται ο λόγος του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε αγωγή προς την αντίστοιχη τιμή για την παράλληλη ομάδα VC, ο οποίος καλείται δείκτης διέγερσης (SI) και πρέπει να είναι ≥ 3 ώστε να δικαιολογείται η ταξινόμηση μιας ελεγχόμενης ουσίας ως δυνάμει ευαισθητοποιητικής για το δέρμα. Οι διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο βασίζονται στη χρήση ραδιοσήμανσης in vivo για τη μέτρηση ενός αυξημένου αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στους αποχετευτικούς ωτικούς λεμφαδένες. Ωστόσο, επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται και άλλα τελικά σημεία για την εκτίμηση του αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, υπό τον όρο ότι πληρούνται απόλυτα οι απαιτήσεις των προτύπων για τις επιδόσεις (προσάρτημα 1).

▼M3

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Επιλογή ζωικού είδους

7. Το είδος που έχει επιλεγεί για τη συγκεκριμένη δοκιμή είναι ο ποντικός. Χρησιμοποιούνται νεαροί ενήλικες θηλυκοί ποντικοί της φυλής CBA/Ca ή CBA/J, που δεν έχουν ποτέ γεννήσει ούτε εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της μελέτης, η ηλικία των ζώων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και οι διαφορές βάρους μεταξύ τους πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το 20 % της μέσης τιμής. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η χρήση άλλων φυλών, καθώς και αρσενικών ζώων, εφόσον έχουν συγκεντρωθεί επαρκή δεδομένα από τα οποία προκύπτει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές απόκρισης κατά την LLNA, οφειλόμενες ειδικά στη φυλή και/ή το φύλο.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

8. Οι ποντικοί πρέπει να στεγάζονται σε ομάδες (23), εκτός εάν η ατομική στέγασή τους δικαιολογείται με επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εντούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12ώρου. Για τη διατροφή επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

Προετοιμασία των ζώων

9. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός (αλλά όχι με αναγνωριστικό ενώτιο οποιασδήποτε μορφής) και παραμένουν στους κλωβούς τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες. Πριν από την έναρξη της αγωγής, εξετάζονται όλα τα ζώα για να είναι βέβαιο ότι δεν παρουσιάζουν εμφανείς βλάβες του δέρματος.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοσολογίας

10. Πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού, τα στερεά χημικά προϊόντα πρέπει να διαλύονται, ή να σχηματίζεται εναιώρημά τους, σε κατάλληλους διαλύτες/φορείς και να αραιώνονται, εφόσον ενδείκνυται. Τα υγρά χημικά προϊόντα μπορούν να εφαρμόζονται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Τα αδιάλυτα χημικά προϊόντα, όπως αυτά που συναντώνται συνήθως στα ιατροτεχνολογικά είδη, πρέπει να υποβάλλονται σε εξαντλητική εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη, ώστε να παραλαμβάνονται όλα τα εκχυλίσιμα συστατικά για δοκιμή πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού. Τα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

Έλεγχος αξιοπιστίας

11. Χρησιμοποιούνται χημικά προϊόντα ως θετικοί μάρτυρες για να καταδειχθεί η ορθή εκτέλεση της δοκιμασίας με την απόκριση, με επαρκή και αναπαραγώγιμη ευαισθησία, σε ευαισθητοποιητική ελεγχόμενη ουσία για την οποία έχει χαρακτηριστεί επακριβώς το μέγεθος της απόκρισης. Συνιστάται η συμπερίληψη παράλληλου θετικού μάρτυρα επειδή καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να εκτελεί με επιτυχία κάθε δοκιμασία και καθιστά δυνατή την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και συγκρισιμότητας. Επίσης, καθώς ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη χρήση θετικού μάρτυρα σε κάθε μελέτη, συνιστάται στους χρήστες να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών πριν από τη διεξαγωγή της LLNA. Συνιστάται, επομένως, η χρήση παράλληλου θετικού μάρτυρα ως συνήθης πρακτική, ώστε να μη χρειάζονται πρόσθετες δοκιμές σε ζώα για την κάλυψη των αναγκών που μπορεί να δημιουργήσει η περιοδική χρήση θετικών μαρτύρων (βλέπε παράγραφο 12). Ένας θετικός μάρτυρας θα πρέπει να δίδει θετική απόκριση κατά την LLNA σε επίπεδα έκθεσης τα οποία αναμένεται να προκαλέσουν αύξηση του SI σε τιμή άνω του 3 σε σύγκριση με την ομάδα αρνητικού μάρτυρα. Η δόση για τον θετικό μάρτυρα θα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να μην προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος ή συστημική τοξικότητα και η επαγωγή να είναι αναπαραγώγιμη αλλά όχι υπερβολική (δηλαδή οι τιμές SI > 20 θεωρούνται υπέρμετρες). Οι προτιμώμενοι θετικοί μάρτυρες είναι το

▼M3

διάλυμα εξυλοκινναμωμικής αλδεΰδης (αριθ. Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) 25 % σε μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v) και το διάλυμα μερκαπτο-βενζοθειαζολίου (αριθ. CAS 149-30-4) 5 % σε *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (βλέπε προσάρτημα 1, πίνακας 1). Σε ορισμένες, δεόντως αιτιολογημένες περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλοι θετικοί μάρτυρες που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια.

12. Παρά τη σύσταση για συμπερίληψη παράλληλης ομάδας θετικού μάρτυρα, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να αρκεί η περιοδική δοκιμή του θετικού μάρτυρα (δηλαδή ανά διαστήματα που δεν υπερβαίνουν το εξάμηνο) για εργαστήρια που εκτελούν τακτικά LLNA (δηλαδή με συχνότητα τουλάχιστον μηνιαία) και διαθέτουν εδραιωμένη ιστορική βάση δεδομένων για τον θετικό μάρτυρα, η οποία καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να επιτυγχάνει αναπαραγώγιμα και ορθά αποτελέσματα με τους θετικούς μάρτυρες. Η επαρκής τεχνική ικανότητα ως προς την LLNA μπορεί να αποδειχθεί με την επίτευξη σταθερών θετικών αποτελεσμάτων με τον θετικό μάρτυρα σε 10 τουλάχιστον ανεξάρτητες δοκιμές που έχουν διεξαχθεί εντός εύλογου χρονικού διαστήματος, δηλαδή μικρότερου από ένα έτος.

13. Πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πάντοτε παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα όταν επέρχονται διαδικαστικές αλλαγές στην LLNA (π.χ. αλλαγή ειδικευμένου προσωπικού, αλλαγή υλικών και/ή αντιδραστηρίων της μεθόδου δοκιμών ή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται σε αυτή, αλλαγή της προέλευσης των πειραματόζωων), οι οποίες πρέπει να τεκμηριώνονται στις εκθέσεις του εργαστηρίου. Πρέπει να εξετάζονται οι επιπτώσεις των αλλαγών αυτών στην επάρκεια της ήδη συγκροτημένης ιστορικής βάσης δεδομένων, προκειμένου να κριθεί αν είναι απαραίτητη η δημιουργία νέας ιστορικής βάσης δεδομένων για την τεκμηρίωση της σταθερότητας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν με τους θετικούς μάρτυρες.

14. Οι ερευνητές θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η απόφαση για διεξαγωγή περιοδικής και όχι ταυτόχρονης μελέτης με θετικό μάρτυρα επηρεάζει έμμεσα την επάρκεια και τη δυνατότητα αποδοχής των αρνητικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν χωρίς παράλληλο θετικό μάρτυρα κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ των περιοδικών μελετών με θετικό μάρτυρα. Για παράδειγμα, σε περίπτωση ψευδαρνητικού αποτελέσματος της περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα, μπορεί να αμφισβητηθούν τα αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν για την ελεγχόμενη ουσία κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ της τελευταίας αποδεκτής περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα και της μη αποδεκτής. Οι συνέπειες αυτές θα πρέπει να λαμβάνονται επιμελώς υπόψη όταν κρίνεται αν θα συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ή θα διεξάγονται απλώς περιοδικές μελέτες με θετικούς μάρτυρες. Θα πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερου αριθμού ζώων στην παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα, εφόσον δικαιολογείται από επιστημονική άποψη και το εργαστήριο καταδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης μικρότερου αριθμού ποντικών με βάση ειδικά για το ίδιο ιστορικά δεδομένα (12).

15. Παρόλο που ο θετικός μάρτυρας θα πρέπει να ελέγχεται στον φορέα που είναι γνωστό ότι αποσπά σταθερή απόκριση (π.χ. μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου σε αναλογία 4:1, v/v), ενδέχεται να υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι νομοθετικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τη διεξαγωγή δοκιμών και σε μη τυποποιημένο φορέα (κλινικώς/χημικώς συναφές σκεύασμα) (24). Σε περίπτωση δοκιμής του παράλληλου θετικού μάρτυρα και της ελεγχόμενης ουσίας σε διαφορετικούς φορείς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται χωριστός μάρτυρας VC για τον παράλληλο θετικό μάρτυρα.

16. Όταν αξιολογούνται ελεγχόμενες ουσίες που ανήκουν σε συγκεκριμένη τάξη χημικών ουσιών ή προκαλούν συγκεκριμένο φάσμα αποκρίσεων, είναι ενδεχομένως χρήσιμες και οι ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης για να καταδειχθεί η ορθή λειτουργία της μεθόδου ως προς την ανίχνευση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των συγκεκριμένων ειδών ελεγχόμενων ουσιών. Οι κατάλληλες ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες:

— δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη της ελεγχόμενης ουσίας,

— γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που προέρχονται από την LLNA,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που αφορούν άλλα ζωικά μοντέλα και/ή τον άνθρωπο.

▼M3

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αριθμός ζώων και επίπεδα δόσεων

17. Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα, με τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, συν μια παράλληλη ομάδα αρνητικού μάρτυρα, που υποβάλλεται σε αγωγή μόνο με τον φορέα της ελεγχόμενης ουσίας, και έναν θετικό μάρτυρα (παράλληλο ή πρόσφατο, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-14). Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο δοκιμής με πολλαπλές δόσεις της ουσίας που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας, κυρίως στις περιπτώσεις διαλειπουσών δοκιμών με θετικό μάρτυρα. Η μεταχείριση και η αγωγή των ζώων των ομάδων-μαρτύρων, εκτός του ότι αυτά δεν υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει κατά τα άλλα να είναι πανομοιότυπες με των ζώων των ομάδων αγωγής.

18. Η επιλογή των δόσεων και του φορέα πρέπει να βασίζεται στις συστάσεις των βιβλιογραφικών πηγών (3) και (5). Επιλέγονται κατά κανόνα διαδοχικές δόσεις από κατάλληλη σειρά συγκεντρώσεων, όπως 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % κ.λπ. Η επιλογή της χρησιμοποιούμενης σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να συνοδεύεται από επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Κατά την επιλογή των τριών διαδοχικών συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα υπάρχοντα τοξικολογικά στοιχεία (π.χ. οξεία τοξικότητα και δερματικός ερεθισμός) και στοιχεία για τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας (και/ή ουσιών ανάλογης δομής) που ενδιαφέρουν, έτσι ώστε η υψηλότερη συγκέντρωση να μεγιστοποιεί την έκθεση, χωρίς να προκαλεί συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (3) (25). Εάν δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία, μπορεί να χρειάζεται δοκιμή προδιαλογής (βλέπε παραγράφους 21-24).

19. Ο φορέας πρέπει να μην προκαλεί συστηματικά και άλλα σφάλματα στα αποτελέσματα των δοκιμών και να επιλέγεται με γνώμονα τη μεγιστοποίηση της διαλυτότητας, ώστε να προκύπτει η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση και, ταυτόχρονα, να σχηματίζεται κατάλληλο διάλυμα/εναιώρημα για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας. Συνιστώνται οι ακόλουθοι φορείς: μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο, μεθυλαιθυλκετόνη, προπυλενογλυκόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (19), χωρίς να αποκλείεται η χρήση άλλων, εφόσον παρέχεται επαρκής επιστημονική αιτιολόγηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται η χρήση, ως πρόσθετου μάρτυρα, ενός κλινικώς συναφούς διαλύτη ή του σκευάσματος του εμπορίου με τη μορφή του οποίου διατίθεται στην αγορά η ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την ενσωμάτωση των υδρόφιλων ελεγχόμενων ουσιών σε ένα σύστημα φορέα το οποίο διαβρέχει το δέρμα και δεν απορρέει αμέσως, με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτοποιητών (π.χ. 1 % Pluronic® L92). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να αποφεύγονται οι εξ ολοκλήρου υδατικοί φορείς.

20. Η επεξεργασία λεμφαδένων μεμονωμένων ποντικών επιτρέπει την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων και τη στατιστική ανάλυση της διαφοράς μεταξύ των μετρήσεων της ελεγχόμενης ουσίας και των μετρήσεων της ομάδας VC (βλέπε παράγραφο 35). Επιπλέον, η συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα καθιστά εφικτή την αξιολόγηση της δυνατότητας μείωσης του αριθμού ποντικών της ομάδας θετικού μάρτυρα (12). Επίσης, μολονότι ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα, ενδέχεται να θεωρούν αποδεκτά τα συγχωνευμένα δεδομένα για ζώα. Στις περιπτώσεις αυτές, οι χρήστες θα έχουν ίσως την ευχέρεια να συγκεντρώνουν είτε ατομικά είτε συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα.

Δοκιμή προδιαλογής

21. Όταν δεν υπάρχουν στοιχεία για τον προσδιορισμό της μέγιστης δόσης προς δοκιμή (βλέπε παράγραφο 18), θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή προδιαλογής, προκειμένου να καθοριστεί το κατάλληλο επίπεδο δόσης για τη δοκιμή με LLNA. Η δοκιμή προδιαλογής αποσκοπεί στην καθοδήγηση κατά την επιλογή του ανώτατου επιπέδου δόσης το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κυρίως μελέτη LLNA, στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη συγκέντρωση η οποία επάγει συστημική τοξικότητα (βλέπε παράγραφο 24) και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (βλέπε παράγραφο 23). Το ανώτατο επίπεδο δόσης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή πρέπει να είναι το 100 % της ελεγχόμενης ουσίας, εάν αυτή είναι υγρή, ή η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση, προκειμένου για στερεά ή εναιωρήματα.

▼M3

22. Η δοκιμή προδιαλογής διεξάγεται στις ίδιες συνθήκες όπως η κυρίως μελέτη LLNA, εκτός από την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού στους λεμφαδένες, η οποία παραλείπεται, και τη δυνατότητα μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε κάθε δοσολογική ομάδα. Προτείνεται η χρήση ενός ή δύο ζώων ανά δοσολογική ομάδα. Όλοι οι ποντικοί εξετάζονται καθημερινά για την ανίχνευση κλινικών σημείων συστημικής τοξικότητας ή τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Καταγράφεται το βάρος σώματος πριν από την έναρξη και πριν από τον τερματισμό της δοκιμής (6η ημέρα). Εξετάζονται και τα δύο αυτιά κάθε ποντικού για την ανίχνευση ερυθήματος, το οποίο βαθμολογείται με τη βοήθεια του πίνακα 1 (25). Μετράται το πάχος των αυτιών με παχύμετρο (π.χ. ψηφιακό μικρόμετρο ή παχύμετρο Peacock Dial) την 1η ημέρα (πριν από τη χορήγηση της δόσης), την 3η ημέρα (περίπου 48 ώρες μετά την πρώτη δόση) και την 6η ημέρα. Επιπλέον, το πάχος των αυτιών είναι δυνατόν να προσδιοριστεί την 6η ημέρα με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας, οι οποίοι πρέπει να εκτελούνται μετά τη θανάτωση των ζώων με ευθανασία. Μια βαθμολογία ερυθήματος ≥ 3 και/ή η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά ≥ 25 %, σε οποιαδήποτε ημέρα μέτρησης, αποτελούν ενδείξεις υπέρμετρου τοπικού ερεθισμού του δέρματος (26) (27). Ως μέγιστη δόση για την κυρίως μελέτη LLNA επιλέγεται η αμέσως χαμηλότερη δόση στη σειρά συγκεντρώσεων της προδιαλογής (βλέπε παράγραφο 18) η οποία δεν επάγει συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος.

Πίνακας 1

Βαθμολογία ερυθήματος

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Απουσία ερυθήματος	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα τεύτλων) έως σχηματισμός εσχάρας που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθήματος	4

23. Εκτός από την αύξηση του πάχους των αυτιών κατά 25 % (26) (27), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των ερεθιστικών ουσιών κατά την LLNA η στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους των αυτιών των ποντικών που υποβάλλονται σε αγωγή σε σύγκριση με τους ποντικούς-μάρτυρες (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ωστόσο, η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά λιγότερο από 25 %, έστω και αν είναι στατιστικά σημαντική, δεν έχει συσχετιστεί ειδικά με υπέρμετρο ερεθισμό (30) (32) (33) (34).

24. Οι ακόλουθες κλινικές παρατηρήσεις, εντασσόμενες σε ολοκληρωμένη εκτίμηση, είναι δυνατόν να αποτελούν ένδειξη συστημικής τοξικότητας (35) (36) και, κατ' επέκταση, να υποδεικνύουν το ανώτατο επίπεδο δόσης προς χρήση στην κυρίως μελέτη LLNA: αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος (π.χ. ανόρθωση τριχών, αταξία, τρόμοι, σπασμοί), στη συμπεριφορά (π.χ. επιθετικότητα, αλλαγή όσον αφορά την περιποίηση του σώματος, έντονη μεταβολή της κινητικότητας), στον αναπνευστικό ρυθμό (δηλαδή μεταβολές της συχνότητας και της έντασης των αναπνοών, όπως δύσπνοια, ασθμαίνουσα αναπνοή και ρόγχος), καθώς και στην κατανάλωση τροφής και νερού. Επιπλέον, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση τα σημεία λήθαργου και/ή απουσίας αντίδρασης σε ερεθίσματα και κάθε κλινικό σημείο που υπερβαίνει τον ελαφρό ή στιγμιαίο πόνο και δυσφορία, η μείωση του βάρους σώματος κατά > 5 % μεταξύ 1ης και 6ης ημέρας και η θνησιμότητα. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και όσα παρουσιάζουν έκδηλο πόνο ή σημεία έντονης και διαρκούς δυσφορίας, πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (37).

▼M3

Πρόγραμμα πειραμάτων της κυρίως μελέτης

25. Το πρόγραμμα πειραμάτων της δοκιμασίας έχει ως εξής:

— *1η ημέρα:* Κάθε ζώο ζυγίζεται χωριστά και καταγράφονται το βάρος του και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Στη ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού τοποθετούνται 25 μL κατάλληλης αραίωσης της ελεγχόμενης ουσίας, του φορέα μόνου ή του θετικού μάρτυρα (παράλληλου ή πρόσφατου, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15).

— *2η και 3η ημέρα:* Επαναλαμβάνεται η διαδικασία εφαρμογής της ουσίας όπως την πρώτη ημέρα.

— *4η και 5η ημέρα:* Καμία αγωγή.

— *6η ημέρα:* Καταγράφεται το βάρος κάθε ζώου. Σε όλους τους ποντικούς, ελεγχόμενους και μάρτυρες, χορηγούνται με ένεση μέσω της ουραίας φλέβας 250 μL στείρου φυσιολογικού ορού με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS), ο οποίος περιέχει 20 μCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) ραδιοσημασμένης με τρίτιο (^{3}H)-μεθυλοθυμιδίνης. Εναλλακτικά, χορηγούνται σε όλους τους ποντικούς, με ένεση μέσω της ουραίας φλέβας, 250 μL PBS που περιέχει 2 μCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-ιωδοδεσοξυουριδίνης και φθοροδεσοξυουριδίνη σε συγκέντρωση 10^{-5} M. Μετά από πέντε ώρες, τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία. Εκτέμνονται οι αποχετευτικοί ωτικοί λεμφαδένες από κάθε αυτί ποντικού και συνενώνονται σε PBS ανά ζώο (προσέγγιση μεμονωμένου ζώου). Εναλλακτικά, εκτέμνονται οι λεμφαδένες από κάθε αυτί και συνενώνονται σε PBS ανά ομάδα ζώων που υποβλήθηκε σε αγωγή (προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής). Λεπτομέρειες και διαγράμματα για την αναγνώριση και την εκτομή των λεμφαδένων παρέχονται στη βιβλιογραφική πηγή (12). Για την περαιτέρω παρακολούθηση της τοπικής απόκρισης του δέρματος κατά την κυρίως μελέτη, το πρωτόκολλό της μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετες παραμέτρους, όπως βαθμολογία του ωτικού ερυθήματος ή μετρήσεις του πάχους των αυτιών (με τη βοήθεια παχυμέτρου ή με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας κατά τη νεκροψία).

Παρασκευή κυτταρικών εναιωρημάτων

26. Παρασκευάζεται εναιώρημα μεμονωμένων λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες που έχουν ληφθεί με αμφοτερόπλευρη εκτομή, σύμφωνα με την προσέγγιση μεμονωμένου ζώου ή, εναλλακτικά, με την προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής, με ήπια μηχανική διάσπαση μέσω πλέγματος από ανοξείδωτο χάλυβα με οπές των 200 μm ή με άλλη αποδεκτή τεχνική σχηματισμού εναιωρήματος μεμονωμένων κυττάρων. Τα λεμφοκύτταρα εκπλύνονται δύο φορές με περίσσεια PBS και ακολουθεί καταβύθιση του DNA με τριχλωροξικό οξύ (TCA) 5 % σε θερμοκρασία 4 °C για 18 ώρες (3). Τα σφαιρίδια του ιζήματος μεταφέρονται σε φιαλίδια σπινθηρισμών που περιέχουν 10 mL υγρού σπινθηρισμών για μέτρηση του τριτίου, αφού προηγουμένως παρασκευαστεί νέο εναιώρημά τους σε 1 mL TCA, ή μεταφέρονται κατευθείαν σε σωλήνες απαριθμητή ακτινοβολίας γ για μέτρηση του ιωδίου ^{125}I.

Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (ενσωματωμένη ραδιενέργεια)

27. Η ενσωμάτωση ^{3}H-μεθυλοθυμιδίνης μετράται με απαρίθμηση σπινθηρισμών ακτινοβολίας β, σε διασπάσεις ανά λεπτό (dpm). Η ενσωμάτωση ^{125}I-ιωδοδεσοξυουριδίνης μετράται με απαρίθμηση ^{125}I, επίσης σε dpm. Ανάλογα με την εφαρμοζόμενη προσέγγιση, η ενσωμάτωση εκφράζεται είτε σε dpm/ποντικό (προσέγγιση μεμονωμένου ζώου) ή σε dpm/ομάδα αγωγής (προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής).

Περιορισμένη LLNA

28. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στις οποίες χρειάζεται να επιβεβαιωθεί, για ρυθμιστικούς λόγους, μια αρνητική πρόγνωση δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης, επιτρέπεται η χρήση ενός προαιρετικού πρωτοκόλλου περιορισμένης LLNA (rLLNA) (16) (17) (18) που προβλέπει μικρότερο αριθμό ζώων, υπό τον όρο ότι τηρούνται όλες οι υπόλοιπες προδιαγραφές του πρωτοκόλλου της LLNA που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Για την εφαρμογή της προσέγγισης rLLNA θα πρέπει να προβάλλονται σαφείς λόγοι και επιστημονική αιτιολόγηση. Εάν προκύψει θετικό ή αμφίβολο αποτέλεσμα, ενδέχεται να χρειαστούν πρόσθετες δοκιμές για την ερμηνεία ή τη διασαφήνιση των ευρημάτων.

▼M3

29. Δεδομένου ότι η μόνη διαφορά μεταξύ των πρωτοκόλλων των μεθόδων δοκιμών LLNA και rLLNA είναι η μείωση του αριθμού των δοσολογικών ομάδων, η rLLNA δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη σχέση δόσης-απόκρισης. Συνεπώς, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται όταν χρειάζονται στοιχεία για τη σχέση δόσης-απόκρισης. Όπως και στην LLNA πολλαπλών δόσεων, η συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας που αξιολογείται κατά την rLLNA πρέπει να είναι η μέγιστη συγκέντρωση η οποία δεν επάγει έκδηλη συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος στους ποντικούς (βλέπε παράγραφο 18).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Κλινικές παρατηρήσεις

30. Κάθε ποντικός πρέπει να εξετάζεται με προσοχή, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, για την ανίχνευση κλινικών σημείων είτε τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας είτε συστημικής τοξικότητας. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ποντικό. Τα σχέδια παρακολούθησης πρέπει να περιλαμβάνουν κριτήρια για τον ταχύ εντοπισμό, με σκοπό την ευθανασία, των ποντικών που εμφανίζουν συστημική τοξικότητα ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση του δέρματος (37).

Βάρος σώματος

31. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 25, το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετράται κατά την έναρξη της δοκιμής και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

32. Τα αποτελέσματα για κάθε ομάδα αγωγής εκφράζονται σε SI. Όταν εφαρμόζεται η προσέγγιση μεμονωμένου ζώου, ο SI προκύπτει με διαίρεση της μέσης τιμής dpm/ποντικό κάθε ομάδας αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία, όπως επίσης και της ομάδας θετικού μάρτυρα, διά της μέσης τιμής dpm/ποντικό της ομάδας που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/ομάδας VC. Στην περίπτωση αυτή, ο μέσος SI για τις ομάδες VC ισούται με τη μονάδα. Όταν εφαρμόζεται η προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής, ο SI προκύπτει με διαίρεση της συγχωνευμένης ενσωμάτωσης ραδιενεργού ισοτόπου σε κάθε ομάδα αγωγής διά της ενσωμάτωσης στη συγχωνευμένη ομάδα VC. Το αποτέλεσμα της πράξης αυτής είναι η μέση τιμή SI.

33. Στη διαδικασία λήψης απόφασης, ένα αποτέλεσμα θεωρείται θετικό όταν SI $\geq$ 3. Ωστόσο, όταν κρίνεται αν ένα οριακό αποτέλεσμα θα χαρακτηριστεί ή όχι θετικό, μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται η ισχύς της σχέσης δόσης-απόκρισης, η στατιστική σημαντικότητα και η σταθερότητα των αποκρίσεων των μαρτύρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα και των θετικών μαρτύρων (4) (5) (6).

34. Εάν απαιτείται διασαφήνιση των αποτελεσμάτων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφορες ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, μεταξύ των οποίων το κατά πόσον έχει δομική σχέση με γνωστές ευαισθητοποιητικές για το δέρμα ουσίες, το κατά πόσον προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος του ποντικού και το είδος της σχέσης δόσης-απόκρισης που διαπιστώθηκε. Αυτά και άλλα κριτήρια αναλύονται στη βιβλιογραφική πηγή (7).

35. Η συλλογή δεδομένων ραδιενέργειας σε επίπεδο μεμονωμένου ποντικού καθιστά δυνατή τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων για τη διαπίστωση της ύπαρξης σχέσης δόσης-απόκρισης και του βαθμού της σχέσης αυτής. Η ενδεχόμενη στατιστική εκτίμηση θα μπορούσε να περιλαμβάνει αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης, καθώς και κατάλληλα προσαρμοσμένες συγκρίσεις των ομάδων δοκιμής (π.χ. συγκρίσεις κατά ζεύγη μεταξύ της ομάδας που λαμβάνει τη δόση και της παράλληλης ομάδας VC). Οι στατιστικές αναλύσεις είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν, λόγου χάριν, γραμμική παλινδρόμηση ή δοκιμή Williams για την εκτίμηση των τάσεων της απόκρισης σε σχέση με τη δόση και δοκιμή Dunnett για τις συγκρίσεις κατά ζεύγη. Κατά την επιλογή της ενδεδειγμένης μεθόδου στατιστικής ανάλυσης, ο ερευνητής θα πρέπει να έχει επίγνωση των πιθανώς άνισων διακυμάνσεων (διασπορών) και άλλων συναφών προβλημάτων τα οποία ενδέχεται να επιβάλλουν μετασχηματισμό των δεδομένων ή μη παραμετρική στατιστική ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, ενδέχεται να χρειαστεί να εκτελέσει ο ερευνητής υπολογισμούς του SI και στατιστικές αναλύσεις με και χωρίς ορισμένα σημεία δεδομένων (καλούμενα μερικές φορές «έκτροπες τιμές»).

▼M3

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Δεδομένα

36. Τα δεδομένα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα. Στην περίπτωση της προσέγγισης μεμονωμένου ζώου, αναφέρονται η τιμή dpm για κάθε ζώο, η ομαδική μέση τιμή dpm/ζώο, η σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα VC. Στην περίπτωση της προσέγγισης συγχωνευμένης ομάδας αγωγής, αναφέρονται η μέση τιμή/διάμεσος dpm και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα VC.

Έκθεση δοκιμής

37. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία και μάρτυρες:

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS και EC, εφόσον υπάρχουν, πηγή, καθαρότητα, γνωστές προσμίξεις, αριθμός παρτίδας),

— σύσταση και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. πτητικότητα, σταθερότητα, διαλυτότητα),

— προκειμένου για μείγματα, σύνθεση και εκατοστιαία αναλογία των συστατικών.

Διαλύτης/φορέας:

— στοιχεία ταυτότητας (καθαρότητα, συγκέντρωση, κατά περίπτωση, όγκος που χρησιμοποιήθηκε),

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Ζώα της δοκιμής:

— προέλευση των ποντικών της φυλής CBA,

— μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή,

— αριθμός και ηλικία των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες για την παρασκευή και εφαρμογή του δείγματος της ελεγχόμενης ουσίας,

— αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της δοκιμής προδιαλογής, εφόσον έχει διεξαχθεί),

— συγκεντρώσεις φορέα και ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν και συνολική ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας που χορηγήθηκε,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού),

— λεπτομέρειες για τα προγράμματα αγωγής και δειγματοληψίας,

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας,

— κριτήρια χαρακτηρισμού της μελέτης ως θετικής ή αρνητικής,

— λεπτομέρειες για τυχόν παρεκκλίσεις από το πρωτόκολλο και επεξήγηση του τρόπου με τον οποίο αυτές επηρεάζουν τον σχεδιασμό και τα αποτελέσματα της μελέτης.

Έλεγχος αξιοπιστίας:

— περίληψη των αποτελεσμάτων του πιο πρόσφατου ελέγχου αξιοπιστίας, συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, τη συγκέντρωση και τον φορέα που χρησιμοποιήθηκε,

— δεδομένα του εργαστηρίου δοκιμών που αφορούν τον παράλληλο και/ή ιστορικό θετικό μάρτυρα και τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα,

▼M3

— εάν δεν συμπεριελήφθη στη δοκιμή παράλληλος θετικός μάρτυρας, ημερομηνία διεξαγωγής της πιο πρόσφατης περιοδικής δοκιμής με θετικό μάρτυρα και σχετική έκθεση του εργαστηρίου, καθώς και έκθεση με λεπτομερή ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τον θετικό μάρτυρα που δικαιολογούν την απόφαση να μη συμπεριληφθεί παράλληλος θετικός μάρτυρας.

Αποτελέσματα:

— βάρος κάθε ποντικού κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο θανάτωσης, καθώς και μέση τιμή και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) για κάθε ομάδα αγωγής,

— για κάθε ζώο, χρόνος εκδήλωσης και εξέλιξη των σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου τυχόν ερεθισμού του δέρματος στο σημείο χορήγησης,

— πίνακας με τις τιμές dpm ανά ποντικό (προσέγγιση μεμονωμένου ζώου) ή τις μέσες τιμές/διαμέσους dpm (προσέγγιση συγχωνευμένης ομάδας αγωγής) και τις τιμές SI για κάθε ομάδα αγωγής,

— στην περίπτωση της προσέγγισης μεμονωμένου ζώου, μέση τιμή dpm/ποντικό και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM), καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης έκτροπων τιμών, για κάθε ομάδα αγωγής,

— στην περίπτωση της προσέγγισης μεμονωμένου ζώου, υπολογισμένος SI και κατάλληλο μέτρο μεταβλητότητας στο οποίο συνεκτιμάται η μεταβλητότητα μεταξύ των ζώων, τόσο της ομάδας που υποβάλλεται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία όσο και των ομάδων-μαρτύρων,

— σχέση δόσης-απόκρισης,

— στατιστικές αναλύσεις, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

— σύντομος σχολιασμός των αποτελεσμάτων, της ανάλυσης της σχέσης δόσης-απόκρισης και, κατά περίπτωση, των στατιστικών αναλύσεων, με γνωμάτευση για τον χαρακτηρισμό ή μη της ελεγχόμενης ουσίας ως ευαισθητοποιητικής για το δέρμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llna-rep.pdf]

▼**M3**

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Διατίθεται στον ιστότοπο: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Προσάρτημα 1

Πρότυπα επιδόσεων για την αξιολόγηση προτεινόμενων παρεμφερών ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών δερματικής ευαισθητοποίησης LLNA

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Σκοπός των προτύπων για τις επιδόσεις είναι να παρέχουν τη βάση με την οποία είναι δυνατόν να διαπιστωθεί ότι νέες μέθοδοι δοκιμών —αποκλειστικές (δηλαδή κατοχυρωμένες με δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, με εμπορικά σήματα, με καταχώριση) και μη— διαθέτουν επαρκή ορθότητα και αξιοπιστία για συγκεκριμένες δοκιμές. Τα εν λόγω πρότυπα επιδόσεων βασίζονται σε επικυρωμένες και εγκεκριμένες μεθόδους δοκιμών και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας και της ορθότητας άλλων παρεμφερών μεθόδων (καλούνται κοινώς «δοκιμές me-too»), οι οποίες στηρίζονται σε παρεμφερείς επιστημονικές αρχές και με τις οποίες μετράται ή προβλέπεται η ίδια βιολογική ή τοξική επίδραση (14).

2. Πριν από την υιοθέτηση τροποποιημένων μεθόδων (δηλαδή προτεινόμενων δυνητικών βελτιώσεων σε εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών), πρέπει να διενεργείται αξιολόγηση για να διαπιστωθούν οι επιδράσεις των προτεινόμενων αλλαγών στις επιδόσεις της δοκιμής και ο βαθμός στον οποίο οι εν λόγω αλλαγές επηρεάζουν τα στοιχεία που τροφοδοτούν τις υπόλοιπες συνιστώσες της διαδικασίας επικύρωσης. Ανάλογα με το πλήθος και το είδος των προτεινόμενων αλλαγών, τα δεδομένα που έχουν προκύψει και τα έγγραφα τεκμηρίωσης των εν λόγω αλλαγών, αυτές θα πρέπει να υποβάλλονται είτε στη διαδικασία επικύρωσης που περιγράφεται για τις νέες δοκιμές είτε, όπου ενδείκνυται, σε περιορισμένη εκτίμηση αξιοπιστίας και καταλληλότητας με τη βοήθεια καθιερωμένων προτύπων για τις επιδόσεις (14).

3. Οι παρεμφερείς ή τροποποιημένες μέθοδοι που προτείνεται να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών πρέπει να αξιολογούνται για να διαπιστωθούν η αξιοπιστία και η ορθότητά τους, με τη χρήση χημικών ουσιών που καλύπτουν την πλήρη βαθμολογική κλίμακα της LLNA. Προκειμένου να αποφευχθεί η αδικαιολόγητη χρήση ζώων, συνιστάται ένθερμα σε όσους αναπτύσσουν μοντέλα να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών προτού αρχίσουν μελέτες επικύρωσης σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων και τις κατευθύνσεις που περιλαμβάνει η παρούσα μέθοδος δοκιμών.

4. Τα παρόντα πρότυπα επιδόσεων βασίζονται στα εναρμονισμένα πρότυπα επιδόσεων των κέντρων επικύρωσης εναλλακτικών μεθόδων ICCVAM των ΗΠΑ, ECVAM της Ευρωπαϊκής Επιτροπής και JaCVAM της Ιαπωνίας (12) για την αξιολόγηση της εγκυρότητας παρεμφερών ή τροποποιημένων εκδόσεων της LLNA. Τα πρότυπα επιδόσεων συνίστανται από τα βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, τις συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς και από επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας που πρέπει να επιτυγχάνει ή να υπερβαίνει η προτεινόμενη μέθοδος.

I. **Βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών**

5. Για να εξασφαλίζεται ότι μια παρεμφερής ή τροποποιημένη μέθοδος LLNA είναι μηχανιστικά και λειτουργικά ανάλογη με την LLNA και μετρά την ίδια βιολογική επίδραση, το πρωτόκολλο της μεθόδου δοκιμών πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

   — η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να εφαρμόζεται τοπικά και στα δύο αυτιά των ποντικών,

   — ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων πρέπει να μετράται στους λεμφαδένες που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας,

   — ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων πρέπει να μετράται κατά το επαγωγικό στάδιο της δερματικής ευαισθητοποίησης,

▼M3

— η υψηλότερη δόση που επιλέγεται για τις ελεγχόμενες ουσίες πρέπει να ισούται με τη μέγιστη συγκέντρωση η οποία δεν επάγει συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος στους ποντικούς. Για τις θετικές χημικές ουσίες αναφοράς, η υψηλότερη δόση πρέπει να είναι τουλάχιστον ίση με τις τιμές EC3 της LLNA για την εκάστοτε χημική ουσία αναφοράς, χωρίς να προκαλεί συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος στους ποντικούς,

— σε κάθε μελέτη πρέπει να συμπεριλαμβάνεται παράλληλος μάρτυρας VC και, όπου ενδείκνυται, πρέπει να χρησιμοποιείται παράλληλος θετικός μάρτυρας,

— πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα,

— επιτρέπεται να συγκεντρώνουν είτε ατομικά είτε συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα.

Εάν δεν πληρούται οποιοδήποτε από τα ανωτέρω κριτήρια, τα παρόντα πρότυπα επιδόσεων δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επικύρωση της παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου.

II. **Κατάλογος ελάχιστων ουσιών αναφοράς**

6. Στα εναρμονισμένα πρότυπα επιδόσεων των κέντρων ICCVAM των ΗΠΑ, ECVAM της Ευρωπαϊκής Επιτροπής και JaCVAM της Ιαπωνίας (12) προσδιορίζονται 18 ουσίες αναφοράς που θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ' ελάχιστο όριο, καθώς και τέσσερις προαιρετικές ουσίες αναφοράς (δηλαδή ουσίες με τις οποίες έχουν προκύψει ψευδοθετικά ή ψευδαρνητικά αποτελέσματα κατά την LLNA σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των δοκιμών στον άνθρωπο και σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδος B.6 ή OECD Test Guideline 406) και οι οποίες, συνεπώς, παρέχουν τη δυνατότητα να καταδειχθούν επιδόσεις εφάμιλλες ή ανώτερες εκείνων της LLNA) που συμπεριλαμβάνονται στα πρότυπα επιδόσεων της LLNA. Τα κριτήρια βάσει των οποίων επιλέχθηκαν οι εν λόγω χημικές ουσίες ήταν τα εξής:

— ο κατάλογος των χημικών ουσιών αναφοράς καλύπτει τα είδη ουσιών που συνήθως υποβάλλονται σε δοκιμή για να διαπιστωθεί το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησης και το φάσμα αποκρίσεων που η LLNA είναι ικανή να μετρά ή να προβλέπει,

— η χημική δομή των ουσιών είναι επακριβώς καθορισμένη,

— για κάθε ουσία υπάρχουν δεδομένα από δοκιμές LLNA σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδος B.6 ή OECD Test Guideline 406) (13) και (στο μέτρο του δυνατού) δεδομένα από μελέτες στον άνθρωπο, και

— οι ουσίες είναι ευρέως διαθέσιμες στο εμπόριο.

Οι συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς παρατίθενται στον πίνακα 1. Οι μελέτες στις οποίες χρησιμοποιούνται οι προτεινόμενες χημικές ουσίες αναφοράς πρέπει να αξιολογούνται με τον φορέα που προβλέπεται για τις ουσίες αυτές στον πίνακα 1. Εάν μια ουσία του πίνακα δεν είναι διαθέσιμη, επιτρέπεται η χρήση άλλων ουσιών που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια επιλογής, με επαρκή αιτιολόγηση.

▼M3

Πίνακας 1

Συνιστωμενες χημικές ουσίες αναφοράς για τα πρότυπα επιδόσεων της LLNA

A/A	Χημική ουσία ([1])	Αριθ. CAS	Μορφή	Veh ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x - 2,0x EC3	Πραγματικό εύρος τιμών EC3	LLNA έναντι GP	LLNA έναντι δοκιμών στον άνθρωπο
1	5-Χλωρο-2-μεθυλ-4-ισοθειαζολινόνη-3 (CMI)/2-μεθυλ-4-ισοθειαζολινόνη-3 (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Φαινυλενοδιαμίνη	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Χλωριούχο κοβάλτιο	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Ισοευγενόλη	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Κιτράλη	5392-40-5	Liq	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Ευγενόλη	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Βενζοϊκό φαινύλιο	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Κινναμωμική αλκοόλη	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Ιμιδαζολιδινυλουρία	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Μεθακρυλικό μεθύλιο	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Χλωροβενζόλιο	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Ισοπροπανόλη	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Α/Α	Χημική ουσία ([1])	Αριθ. CAS	Μορφή	Veh ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x - 2,0x EC3	Πραγματικό εύρος τιμών EC3	LLNA έναντι GP	LLNA έναντι δοκιμών στον άνθρωπο
16	Γαλακτικό οξύ	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Σαλικυλικό μεθύλιο	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Σαλικυλικό οξύ	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Προαιρετικές ουσίες για την απόδειξη βελτιωμένων επιδόσεων σε σχέση με την LLNA										
19	Λαυρυλοθειικό νάτριο	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Διμεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης	97-90-5	Liq	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Ξυλόλιο	1330-20-7	Liq	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Χλωριούχο νικέλιο	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Συντμήσεις: AOO = μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), Αριθ. CAS = αριθμός μητρώου της Chemical Abstracts Service, DMF = *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο, DMSO = διμεθυλοσουλφοξείδιο, DNCB = 2,4-δινιτρο-χλωροβενζόλιο, EC3 = κατ' εκτίμηση συγκέντρωση που απαιτείται για να προκύψει δείκτης διέγερσης ίσος με 3, GP = αποτέλεσμα δοκιμής σε ινδικά χοιρίδια (δηλαδή μέθοδος B. 6 ή OECD Test Guideline 406) (13), HCA = εξυλοκινναμωμική αλδεΰδη, Liq = υγρό, LLNA = αποτέλεσμα τοπικής δοκιμασίας λεμφαδένων σε ποντικό (δηλαδή μέθοδος B. 42 ή OECD Test Guideline 429) (1), MEK = μεθυλαιθυλοκετόνη, NA = δεν εφαρμόζεται επειδή ο δείκτης διέγερσης είναι μικρότερος από 3, NC = δεν έχει υπολογιστεί επειδή τα δεδομένα προέρχονται από μία μόνο μελέτη, Sol = στερεό, Veh = φορέας χρησιμοποιούμενος στη δοκιμή.

(*) Θεωρείται ότι δεν είναι ευαισθητοποιητική για τον άνθρωπο ουσία, με βάση το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν αποτελέσματα κλινικών δοκιμών επιθέματος, δεν συμπεριλαμβάνεται ως αλλεργιογόνο στα έτοιμα αντιδραστήρια για δοκιμές επιθέματος και δεν εντοπίστηκαν αναφορές περιστατικών ευαισθητοποίησης του ανθρώπου.

(**) Δεν υπάρχουν δεδομένα από δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια.

([1]) Τα παρασκευάσματα των χημικών ουσιών πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

([2]) Λόγω των πιθανών επιπτώσεων των διαφόρων φορέων στις επιδόσεις της LLNA, πρέπει να χρησιμοποιείται ο φορέας που συνιστάται για κάθε χημική ουσία αναφοράς (24) (32).

([3]) Μέση τιμή στις περιπτώσεις περισσότερων από μία διαθέσιμων τιμών EC3. Για τις ουσίες αρνητικού αποτελέσματος (δηλαδή με δείκτη διέγερσης κάτω του 3), παρέχεται η μέγιστη ελεγχθείσα συγκέντρωση.

([4]) Πλήθος μελετών LLNA από τις οποίες προέρχονται τα δεδομένα.

([5]) Κυκλοφορεί στο εμπόριο ως Kathon CG (αριθ. CAS 55965-84-9), που είναι μείγμα CMI και MI σε αναλογία 3:1. Η σχετική συγκέντρωση κάθε συστατικού κυμαίνεται από 1,1 % έως 1,25 % (CMI) και από 0,3 % έως 0,45 % (MI). Τα αδρανή συστατικά είναι άλατα του μαγνησίου (21,5 % έως 24 %) και νιτρικός χαλκός (0,15 % έως 0,17 %), ενώ η σύνθεση συμπληρώνεται με νερό σε ποσοστό 74 % έως 77 %. Το Kathon CG διατίθεται ευρέως από τις εταιρείες Sigma-Aldrich και Rohm and Haas (νυν Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Καθορισμένα επίπεδα αξιοπιστίας και ορθότητας**

7. Η ορθότητα της παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου LLNA, αξιολογούμενη με τη βοήθεια των 18 χημικών ουσιών αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ' ελάχιστο όριο, πρέπει να είναι εφάμιλλη ή ανώτερη εκείνης που προβλέπεται στα πρότυπα επιδόσεων της LLNA. Η νέα ή τροποποιημένη μέθοδος θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα την ορθή ταξινόμηση με βάση απόφαση «ναι/όχι». Ενδέχεται, όμως, να μην ταξινομούνται σωστά με τη νέα ή τροποποιημένη μέθοδο όλες οι χημικές ουσίες αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ' ελάχιστο όριο. Για παράδειγμα, σε περίπτωση εσφαλμένης ταξινόμησης μιας από τις ασθενείς ευαισθητοποιητικές ουσίες, πρέπει να εξετάζεται η δυνατότητα αιτιολόγησης της εσφαλμένης ταξινόμησης και χρήσης κατάλληλων συμπληρωματικών δεδομένων (π.χ. αποτελέσματα δοκιμών βάσει των οποίων ταξινομούνται σωστά άλλες ουσίες με φυσικές, χημικές και ευαισθητοποιητικές ιδιότητες ανάλογες με εκείνες της ουσίας που δεν ταξινομήθηκε σωστά) για την απόδειξη της ισοδυναμίας των επιδόσεων. Υπό τις συνθήκες αυτές, η κατάσταση επικύρωσης της νέας ή τροποποιημένης μεθόδου δοκιμών LLNA θα αξιολογείται κατά περίπτωση.

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

8. Για τον προσδιορισμό της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, η νέα ή τροποποιημένη μέθοδος LLNA πρέπει να αξιολογείται με τη χρήση ευαισθητοποιητικής ουσίας που χαρακτηρίζεται επακριβώς με την LLNA. Για τον λόγο αυτό, τα πρότυπα επιδόσεων της LLNA βασίζονται στη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων επαναλαμβανόμενων δοκιμών με εξυλοκινναμωμική αλδεΰδη (HCA). Για την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής αξιοπιστίας πρέπει να συνάγονται τιμές κατωφλίου εκτιμώμενης συγκέντρωσης (ECt) για την HCA από τέσσερις χωριστές δοκιμές που απέχουν χρονικά μεταξύ τους τουλάχιστον μια εβδομάδα. Ένδειξη αποδεκτής ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας αποτελεί η ικανότητα ενός εργαστηρίου να επιτυγχάνει, σε κάθε δοκιμή με HCA, τιμές ECt μεταξύ 5 % και 20 %, οι οποίες αντιστοιχούν στο πεδίο τιμών που προκύπτει αν πολλαπλασιαστεί επί 0,5-2,0 η μέση τιμή EC3 που έχει καθοριστεί για την HCA (10 %) στην LLNA (βλέπε πίνακα 1).

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

9. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα νέας ή τροποποιημένης μεθόδου LLNA πρέπει να εκτιμάται με τη χρήση δύο ευαισθητοποιητικών ουσιών που χαρακτηρίζονται επακριβώς με την LLNA. Τα πρότυπα επιδόσεων της LLNA βασίζονται στη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων δοκιμών που διεξάγονται με HCA και 2,4-δινιτρο-χλωροβενζόλιο (DNCB) σε διαφορετικά εργαστήρια. Πρέπει να συνάγονται ανεξάρτητες τιμές HCA από μία μόνο δοκιμή, διεξαγόμενη σε τρία τουλάχιστον χωριστά εργαστήρια. Προκειμένου να καταδειχθεί αποδεκτή διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, κάθε εργαστήριο πρέπει να επιτυγχάνει τιμές ECt μεταξύ 5 % και 20 % για την HCA και 0,025 % έως 0,1 % για το DNCB, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τα πεδία τιμών που προκύπτουν αν πολλαπλασιαστεί επί 0,5-2,0 η μέση συγκέντρωση EC3 που έχει καθοριστεί για την HCA (10 %) και το DNCB (0,05 %) στην LLNA, αντίστοιχα (βλέπε πίνακα 1).

▼M3

Προσάρτημα 2

Ορισμοί

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (14).

Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: ουσία, ευαισθητοποιητική ή μη, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή(-ές) και αξιόπιστη(-ες) προέλευση(-εις), ii) δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη των ελεγχόμενων ουσιών, iii) γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά, iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Τιμή κατωφλίου εκτιμώμενης συγκέντρωσης (ECt): η κατ' εκτίμηση συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας που είναι αναγκαία για να προκύψει δείκτης διέγερσης ο οποίος αποτελεί ένδειξη θετικής απόκρισης.

Εκτιμώμενη συγκέντρωση τρία (EC3): η κατ' εκτίμηση συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας που είναι αναγκαία για να προκύψει δείκτης διέγερσης ίσος με 3.

Ψευδαρνητικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως αρνητικής ή μη δραστικής με μέθοδο δοκιμών, ενώ στην πραγματικότητα είναι θετική ή δραστική.

Ψευδοθετικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως θετικής ή δραστικής με δοκιμή, ενώ στην πραγματικότητα είναι αρνητική ή μη δραστική.

Κίνδυνος: το δυναμικό δυσμενούς επίδρασης στην υγεία ή στο περιβάλλον. Η δυσμενής επίδραση εκδηλώνεται μόνο εάν τα επίπεδα έκθεσης είναι επαρκή.

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια μπορούν να επιτυγχάνουν ποιοτικά και ποσοτικά παραπλήσια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο και υποβάλλοντας σε δοκιμή τις ίδιες ελεγχόμενες ουσίες. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων» (14).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα εντός του εργαστηρίου» (14).

Δοκιμή me-too: έκφραση της καθομιλουμένης που παραπέμπει σε μέθοδο δοκιμών η οποία είναι δομικά και λειτουργικά ανάλογη με επικυρωμένη και εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς. Η εν λόγω μέθοδος δοκιμών προσφέρεται για ταχεία επικύρωση (catch-up validation). Ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «παρεμφερή μέθοδο δοκιμών» (14).

Έκτροπη τιμή: έκτροπη τιμή (outlier) είναι μια παρατήρηση σε τυχαίο δείγμα πληθυσμού η οποία διαφέρει σημαντικά από άλλες τιμές αυτού του δείγματος.

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι λειτουργικά και μηχανιστικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν: i) βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς και iii) τα ανάλογα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών, όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (14).

Αποκλειστική μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών της οποίας η παραγωγή και η διανομή υπόκεινται σε περιορισμούς βάσει διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας, δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας, εμπορικών σημάτων κ.λπ.

▼**M3**

Διασφάλιση ποιότητας: διαχειριστική διαδικασία με την οποία αξιολογούνται, από άτομα ανεξάρτητα από εκείνα που εκτελούν τις δοκιμές, η τήρηση των προτύπων, των απαιτήσεων και των διαδικασιών τήρησης αρχείων που αφορούν τις εργαστηριακές δοκιμές, καθώς και η ορθότητα της μεταφοράς δεδομένων.

Χημικές ουσίες αναφοράς: χημικές ουσίες που επιλέγονται για να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία επικύρωσης και για τις οποίες είναι ήδη γνωστές οι αποκρίσεις στο σύστημα δοκιμών αναφοράς in vitro ή in vivo ή στο ζωικό είδος που ενδιαφέρει. Οι εν λόγω χημικές ουσίες πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές, αφενός των τάξεων χημικών προϊόντων στις οποίες προβλέπεται ότι θα εφαρμόζεται η μέθοδος δοκιμών και, αφετέρου, του πλήρους φάσματος των αποκρίσεων —ισχυρή, ασθενής, αρνητική— που αναμένονται για τα χημικά προϊόντα στα οποία μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος. Ενδέχεται να απαιτούνται διαφορετικές σειρές χημικών ουσιών αναφοράς για τα διάφορα στάδια της διαδικασίας επικύρωσης, καθώς και για τις διάφορες μεθόδους δοκιμών και χρήσεις των δοκιμών (14).

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την επίδραση που ενδιαφέρει και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση που ενδιαφέρει. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (14).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (14).

Δερματική ευαισθητοποίηση: ανοσολογική διαδικασία που είναι αποτέλεσμα της τοπικής έκθεσης ευπαθούς ατόμου σε επαγωγικό χημικό αλλεργιογόνο, το οποίο προκαλεί δερματική ανοσοαπόκριση που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευαισθητοποίησης εξ επαφής.

Δείκτης διέγερσης (SI): αριθμητική τιμή η οποία υπολογίζεται προκειμένου να εκτιμηθεί το δερματικό ευαισθητοποιητικό δυναμικό μιας ελεγχόμενης ουσίας και ισούται με την αναλογία του πολλαπλασιασμού στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή με την ουσία προς τον πολλαπλασιασμό στην ομάδα που υποβάλλεται ταυτόχρονα σε αγωγή με τον φορέα.

Ελεγχόμενη ουσία (καλούμενη επίσης «ελεγχόμενη χημική ουσία»): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδόσεις επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών από πλευράς ορθότητας και αξιοπιστίας ενδέχεται να μην επαρκούν για να κριθεί αποδεκτή για τον προτεινόμενο σκοπό (14).

▼B

Β.43. ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

1. Η ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών TG 424 (1997) του ΟΟΣΑ.

Η μέθοδος έχει μελετηθεί για να επιτρέπει τη συγκέντρωση των αναγκαίων στοιχείων για την επιβεβαίωση ή τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των νευροτοξικών ιδιοτήτων των χημικών ουσιών σε ενήλικα ζώα. Είναι δυνατόν να συνδυαστεί με υφιστάμενες μεθόδους δοκιμών για μελέτες τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης ή να εφαρμοστεί ως αυτοτελής μελέτη. Συνιστάται η χρήση του καθοδηγητικού εγγράφου του ΟΟΣΑ για τις στρατηγικές και μεθόδους δοκιμών νευροτοξικότητας (1) ως βοηθήματος για το σχεδιασμό μελετών βασιζόμενων στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία όταν μελετώνται τροποποιήσεις των διαδικασιών παρατήρησης και δοκιμών που συνιστώνται για τη συνήθη χρήση της μεθόδου. Το εν λόγω καθοδηγητικό έγγραφο προορίζεται να διευκολύνει την επιλογή άλλων διαδικασιών για εφαρμογή σε ειδικές περιστάσεις.

Η εκτίμηση των νευροτοξικών επιδράσεων στην ανάπτυξη δεν αποτελεί αντικείμενο της παρούσας μεθόδου.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη στην εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών ιδιοτήτων των χημικών ουσιών οι πιθανές νευροτοξικές επιδράσεις. Η μέθοδος δοκιμών συστηματικής τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης περιλαμβάνει ήδη παρατηρήσεις που επιτρέπουν τον αποκλεισμό ή μη της πιθανής νευροτοξικότητας. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό μελετών με σκοπό τη συγκέντρωση περισσότερων πληροφοριών ή την επιβεβαίωση των νευροτοξικών επιδράσεων που παρατηρούνται στις μελέτες συστηματικής τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης. Ωστόσο, από ~~ορισμένα~~ από μελέτες της πιθανότητας νευροτοξικότητας για ορισμένες κατηγορίες χημικών ουσιών ενδέχεται να προκύπτει ότι αυτές αξιολογούνται καλύτερα με την παρούσα μέθοδο, χωρίς να χρειάζεται να υπάρχουν ενδείξεις νευροτοξικότητας από προηγούμενες μελέτες συστηματικής τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης. Τέτοιες μελέτες περιλαμβάνουν για παράδειγμα:

— τη παρατήρηση νευρολογικών συμπτωμάτων ή νευροπαθολογικών βλαβών σε άλλες μελέτες τοξικότητας πλην των μελετών συστηματικής τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης ή

— τη δομική σχέση ή άλλα στοιχεία που συνδέουν την ελεγχόμενη ουσία με γνωστά νευροτοξικά.

Υπάρχουν επίσης και άλλες περιπτώσεις όπου ενδείκνυται η χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών· για περισσότερες λεπτομέρειες, βλ. δημοσίευση (1).

Η παρούσα μέθοδος έχει μελετηθεί κατά τρόπον ώστε να μπορεί να προσαρμόζεται σε συγκεκριμένες ανάγκες σχετικές με την επιβεβαίωση παθολογοανατομικών ευρημάτων νευροτοξικότητας και νευροτοξικών διαταραχών της συμπεριφοράς από τη χρήση ενός χημικού, καθώς και με το χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των νευροτοξικών αντιδράσεων.

▼B

Παλαιότερα, η νευροτοξικότητα ταυτιζόταν με τη νευροπάθεια που συνεπάγεται νευροπαθολογικές βλάβες ή νευρολογικές δυσλειτουργίες, όπως επιληπτικές κρίσεις, παράλυση ή τρόμο. Παρόλο που η νευροπάθεια αποτελεί σημαντική εκδήλωση νευροτοξικότητας, σήμερα είναι πλέον σαφές ότι υπάρχουν πολλά άλλα σημεία τοξικής επίδρασης στο νευρικό σύστημα (π.χ. απώλεια συντονισμού των κινήσεων, περιορισμό των αισθήσεων, δυσλειτουργίες της μάθησης και της μνήμης), που ενδεχομένως δεν αποκαλύπτουν αποκαλύπτονται σε μελέτες νευροπάθειας ή άλλου τύπου.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών νευροτοξικότητας έχει μελετηθεί για να ανιχνεύει σοβαρές επίδρασης στη συμπεριφορά και παθολογικές επιδράσεις στο νευρικό σύστημα ενηλίκων τρωκτικών. Ενώ οι επιδράσεις στη συμπεριφορά, ακόμη και αν δεν συνοδεύονται από μορφολογικές αλλαγές, μπορούν να αποκαλύψουν δυσμενή επίδραση στον οργανισμό, δεν συνδέονται όλες οι διαταραχές της συμπεριφοράς ειδικά με το νευρικό σύστημα. Κατά συνέπεια, οι παρατηρούμενες αλλαγές θα πρέπει να αξιολογούνται σε συνάρτηση με ιστοπαθολογικά, αιματολογικά ή βιοχημικά δεδομένα, καθώς και με δεδομένα για άλλους τύπους συστηματικής τοξικότητας. Οι εξετάσεις που απαιτεί η παρούσα μέθοδος για το χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των νευροτοξικών αντιδράσεων περιλαμβάνουν ειδικές ιστοπαθολογικές εξετάσεις και διαδικασίες μελέτης της συμπεριφοράς, που μπορούν να υποστηριχθούν με ηλεκτροφυσιολογικές ή/και βιοχημικές εξετάσεις (1)(2)(3)(4).

Τα νευροτοξικά μπορούν να δράσουν στο νευρικό σύστημα σε αρκετούς στόχους και με ποικίλους μηχανισμούς. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει μία και μόνη σειρά δοκιμών ικανή να επιτρέψει την πλήρη εκτίμηση των νευροτοξικών ιδιοτήτων όλων των ουσιών, ενδέχεται να είναι αναγκαία η διεξαγωγή άλλων δοκιμών *in vivo* ή *in vitro* ειδικών για τον τύπο της παρατηρούμενης ή προβλεπόμενης νευροτοξικότητας.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί, σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο καθοδηγητικό έγγραφο του ΟΟΣΑ για Στρατηγικές και μεθόδους δοκιμών Νευροτοξικότητας (1), για το σχεδιασμό μελετών με τις οποίες επιδιώκεται ο περαιτέρω χαρακτηρισμός ή η αύξηση της ευαισθησίας του ποσοτικού προσδιορισμού της σχέσης δόσης-απόκρισης ή η ακριβέστερη εκτίμηση του NOAEL ή η επαλήθευση γνωστών κινδύνων ή υπονοιών για κινδύνους από τη χημική ουσία. Για παράδειγμα, είναι δυνατόν να σχεδιαστούν μελέτες για τη διαλεύκανση και την αξιολόγηση του ή των νευροτοξικών μηχανισμών ή για τη συμπλήρωση δεδομένων που έχουν προκύψει από την εφαρμογή των βασικών διαδικασιών μελέτης της συμπεριφοράς και νευροπαθολογικών παρατηρήσεων. Οι εν λόγω μελέτες δεν πρέπει να αναπαράγουν δεδομένα που συγκεντρώνονται με την χρήση των τυπικών διαδικασιών τις οποίες συνιστά η μέθοδος, εάν τα δεδομένα αυτά είναι ήδη διαθέσιμα και δεν θεωρούνται απαραίτητα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης.

Η παρούσα μελέτη νευροτοξικότητας, χρησιμοποιούμενη μόνη ή σε συνδυασμό με άλλες, παρέχει στοιχεία με τα οποία είναι δυνατόν:

— να διαπιστωθεί αν η ελεγχόμενη χημική ουσία προκαλεί μόνιμες ή ανατάξιμες βλάβες στο νευρικό σύστημα·

— να συμβάλλουν Θ στο χαρακτηρισμός των βλαβών του νευρικού συστήματος που συνδέονται με την έκθεση στη χημική ουσία, καθώς και στη κατανόηση των υπεύθυνων μηχανισμών·

▼B

— να προσδιοριστούν οι σχέσεις δόσης-απόκρισης και χρόνου-απόκρισης, προκειμένου να υπολογιστεί το NOAEL (το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό κριτηρίων ασφάλειας για τις χημικές ουσίες).

Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα. Ενδέχεται άλλες οδοί χορήγησης (π.χ. από το δέρμα ή με την εισπνοή) να είναι καταλληλότερες και απαιτούν τροποποίηση των συνιστώμενων διαδικασιών. Τα κριτήρια επιλογής της οδού χορήγησης εξαρτώνται από τον τύπο της έκθεσης του ανθρώπου και τα διαθέσιμα τοξικολογικά στοιχεία ή στοιχεία κινητικής.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Δυσμενής επίδραση: κάθε απόκλιση από τη βασική γραμμή, που συνδέεται με την αγωγή και μειώνει την ικανότητα ενός οργανισμού να επιζεί, να αναπαράγεται ή να προσαρμόζεται στο περιβάλλον του.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας· εκφράζεται σε βάρος ουσίας (g, mg) ή σε βάρος ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου (π.χ. mg/kg) ή σε σταθερές συγκεντρώσεις στο σιτηρέσιο (ppm).

Δοσολογία: γενικός όρος που περικλείει τη δόση, τη συχνότητα χορήγησης και τη διάρκεια της δόσης.

Νευροτοξικότητα: δυσμενής μεταβολή της δομής ή της λειτουργίας του νευρικού συστήματος που οφείλεται στην έκθεση σε χημικούς, βιολογικούς ή φυσικούς παράγοντες.

Νευροτοξικό: κάθε χημικός, βιολογικός ή φυσικός παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει νευροτοξικότητα.

NOAEL: από τα αρχικά του αγγλικού «no-observed-adverse effect level», που σημαίνει το υψηλότερηο επίπεδο δόσης στην οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις σχετιζόμενες με την αγωγή.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Μια σειρά δόσεων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας χορηγούνται από το στόμα σε πολλές ομάδες τρωκτικών εργαστηριακής χρήσης. Συνήθως απαιτούνται επαναλαμβανόμενες δόσεις, ενώ η δοσολογία μπορεί να είναι κάθε 28 ημερών, σε χρονικά διαστήματα μικρότερα του ενός έτους (90 ημέρες) ή σε χρονικά διαστήματα του ενός έτους (ή περισσότερο). Οι διαδικασίες που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για μελέτες οξείας τοξικότητας. Τα ζώα υποβάλλονται σε εξετάσεις που επιτρέπουν τη διαπίστωση ή το χαρακτηρισμό διαταραχών της συμπεριφοράς ή/και νευρολογικών. Στη διάρκεια κάθε περιόδου παρατήρησης αξιολογείται μια σειρά επιδράσεων στη συμπεριφορά που θα μπορούσαν να οφείλονται σε νευροτοξικά. Στο τέλος της δοκιμής, μια υποομάδα ζώων από κάθε φύλο και κάθε ομάδα υποβάλλονται σε έγχυση *in situ* και ακολουθεί παρασκευή τομών εγκεφάλου, νωτιαίου μυελού και περιφερειακών νεύρων για εξέταση.

Όταν η μελέτη διεξάγεται αυτοτελώς για τον αποκλεισμό ή μη της νευροτοξικότητας ή για το χαρακτηρισμό νευροτοξικών επιδράσεων, τα ζώα κάθε ομάδας που δεν επιλέγονται για έγχυση και επακόλουθη ιστοπαθολογική εξέταση (βλέπε πίνακα 1) μπορούν να υποβληθούν σε ειδικές διαδικασίες μελέτης της συμπεριφοράς και σε νευροπαθολογικές, νευροχημικές ή ηλεκτροφυσιολογικές εξετάσεις, οι οποίες συμπληρώνουν τα ευρήματα από τις τυπικές εξετάσεις που απαιτεί η παρούσα μέθοδος (1). Οι συμπληρωματικές αυτές διαδικασίες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στις περιπτώσεις όπου εμπειρικές παρατηρήσεις ή αναμενόμενες επιδράσεις υποδεικνύουν ένα συγκεκριμένο τύπο ή στόχο νευροτοξικότητας μιας χημικής ουσίας. Μια άλλη δυνατότητα είναι η χρήση των υπόλοιπων ζώων για τις εκτιμήσεις που απαιτούν οι μέθοδοι δοκιμών τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης σε τρωκτικά.

▼B

Όταν η παρούσα μέθοδος δοκιμών συνδυάζεται με άλλες μεθόδους, απαιτείται ικανός αριθμός ζώων για να ικανοποιούνται οι απαιτήσεις για τις παρατήρησης και των δύο μεθόδων.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Επιλογή είδους ζώων**

Το προτιμώμενο είδος τρωκτικού είναι ο επίμυς, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη τρωκτικών, με αιτιολόγηση της επιλογής τους. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή νεαρά ενήλικα ζώα που ανήκουν σε φυλές κοινής εργαστηριακής χρήσης. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να μην έχουν ποτέ γεννήσει ούτε να εγκυμονούν. Η χορήγηση των δόσεων θα πρέπει κατά κανόνα να αρχίζει το ταχύτερο δυνατόν μετά τον απογαλακτισμό, κατά προτίμηση όταν τα ζώα είναι ηλικίας το πολύ έξι εβδομάδων και, πάντως, πριν συμπληρώσουν τις εννέα εβδομάδες. Όταν ωστόσο η μελέτη αυτή συνδυάζεται με άλλες, μπορεί να χρειάζεται προσαρμογή της απαίτησης για την ηλικία. Κατά την έναρξη της μελέτης, η διακύμανση του βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου. Στις περιπτώσεις όπου διεξάγεται μια βραχεία μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης ως προκαταρτική μακροχρόνιας μελέτης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης, στις δύο μελέτες.

1.4.2 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (±3 °C). Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12ωρο. Οι δυνατοί, διακεκομμένοι θόρυβοι θα πρέπει να περιορίζονται στο ελάχιστο. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται με την τροφή, στη παρούσα μέθοδο, η ανάγκη παρασκευής κατάλληλου μίγματος είναι δυνατόν να επηρεάσει την επιλογή του σιτηρεσίου. Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται χωριστά ή σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου.

1.4.3 **Προετοιμασία των ζώων**

Υγιή νεαρά ζώα κατανέμονται τυχαία στις ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Η διάταξη των κλουβιών θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα επιδράσεων οφειλόμενων στη θέση των κλουβιών. Τα ζώα σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

1.4.4 **Οδός χορήγησης και παρασκευή των δόσεων**

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά ειδικά τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας από το στόμα. Η ουσία μπορεί να χορηγηθεί με καθετήρα σίτισης, με την τροφή, με το νερό ή σε κάψουλες. Ενδέχεται άλλες οδοί χορήγησης (π.χ. από το δέρμα ή με την εισπνοή) να είναι καταλληλότερες και απαιτούν τροποποίηση των συνιστώμενων διαδικασιών. Τα κριτήρια επιλογής της οδού χορήγησης εξαρτώνται από τον τύπο της έκθεσης του ανθρώπου και τα διαθέσιμα τοξικολογικά στοιχεία ή στοιχεία κινητικής. Θα πρέπει να αναφέρονται οι λόγοι της επιλογής άλλης οδού χορήγησης, καθώς και οι συνακόλουθες τροποποιήσεις των διαδικασιών της παρούσας μεθόδου.

▼B

Εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να παρασκευαστεί διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται να χρησιμοποιούνται, πρωτίστως, υδατικά διαλύματα/εναιωρήματα, με δεύτερα κατά σειρά προτίμησης τα διαλύματα/εναιωρήματα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τελευταία τα διαλύματα/εναιωρήματα σε άλλους φορείς. Οι τοξικολογικές ιδιότητες του φορέα πρέπει να είναι γνωστές. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του: επίδραση στην απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό ή την κατακράτηση της ελεγχόμενης ουσίας, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μεταβολή των τοξικολογικών ιδιοτήτων της, και επίδραση στην κατανάλωση τροφής/νερού από τα ζώα ή στη θρέψη τους.

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1 **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Όταν η μελέτη διεξάγεται αυτοτελώς, κάθε ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας πρέπει να αποτελείται τουλάχιστον από 20 ζώα (10 θηλυκά και 10 αρσενικά) για την αξιολόγηση των λεπτομερών κλινικών και λειτουργικών παρατηρήσεων. Στο τέλος της μελέτης, επιλέγονται τουλάχιστον πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά ζώα μεταξύ των παραπάνω 10 αρσενικών και 10 θηλυκών, υποβάλλονται σε έγχυση *in situ* και χρησιμοποιούνται για λεπτομερή νευροϊστοπαθολογική εξέταση. Εάν ο αριθμός των ζώων μιας δεδομένης ομάδας αγωγής που εξετάζονται για συμπτώματα νευροτοξικότητας είναι περιορισμένος, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στα επιλεγόμενα για έγχυση. Όταν η μελέτη συνδυάζεται με μελέτη τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης, απαιτείται ικανός αριθμός ζώων για να καλύπτονται οι απαιτήσεις και των δύο μελετών. Οι ελάχιστοι αριθμοί ζώων ανά ομάδα για διάφορους συνδυασμούς μελετών παρατίθενται στον πίνακα 1. Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ή ομάδες ανάρρωσης για την παρατήρηση της εμφάνισης ανατάξιμων, μόνιμων ή όψιμων επιδράσεων μετά την αγωγή ή εάν μελετάται το ενδεχόμενο συμπληρωματικών παρατηρήσεων, ο αριθμός των ζώων θα πρέπει να αυξάνεται, ώστε να επαρκεί για την παρατήρηση και την ιστοπαθολογία.

1.5.2 **Ομάδες αγωγής και ομάδα μάρτυρας**

Κατά κανόνα χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες αγωγής και μία ομάδα μάρτυρας. Εάν όμως από την αξιολόγηση άλλων δεδομένων, δεν αναμένονται επιδράσεις με μια επαναλαμβανόμενη δόση 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή. Εάν δεν υπάρχουν κατάλληλα στοιχεία, είναι δυνατόν να διεξαχθεί μελέτη εύρεσης πεδίου τιμών για να βοηθήσει στον καθορισμό των δόσεων που θα χορηγηθούν. Ο τρόπος χρήσης των ζώων της ομάδας μάρτυρα, εκτός του ότι αυτά δεν υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει κατά τα άλλα να είναι πανομοιότυπος με των ζώων των ομάδων αγωγής. Σε περίπτωση χρήσης φορέα για τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας, αυτός θα πρέπει να χορηγείται στην ομάδα μάρτυρα στο μεγαλύτερο χρησιμοποιούμενο όγκο.

1.5.3 **Έλεγχος αξιοπιστίας**

Το εργαστήριο που αναλαμβάνει τη μελέτη θα πρέπει να αποδεικνύει την ικανότητά του να τη διεξάγει, καθώς και την ευαισθησία των διαδικασιών που εφαρμόζει. Τα σχετικά δεδομένα θα πρέπει να καταδεικνύουν την ικανότητα ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού, κατά περίπτωση, των μεταβολών των διαφόρων τελικών σημείων που συνιστά η μέθοδος να παρατηρούνται, όπως η αυτόνομη λειτουργία, η αισθητικότητα, η ισχύς των άκρων και η κινητικότητα. Πληροφορίες για χημικές ουσίες που προκαλούν νευροτοξικές αντιδράσεις διαφόρων τύπων και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες παρέχονται στις δημοσιεύσεις (2) έως (9). Εφόσον τα βασικά σημεία των πειραματικών διαδικασιών παραμένουν αμετάβλητα, μπορεί να χρησιμοποιείται το ιστορικό δεδομένων, το οποίο συνιστάται να ανανεώνεται κατά διαστήματα. Όταν το εργαστήριο τροποποιεί βασικά σημεία του τρόπου εργασίας ή των διαδικασιών της δοκιμής, θα πρέπει να παρουσιάσει νέα δεδομένα που αποδεικνύουν τη διατήρηση της ευαισθησίας των διαδικασιών.

▼B

1.5.4 **Επιλογή δόσεων**

Οι δόσεις θα πρέπει να επιλέγονται λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα που τυχόν έχουν προηγουμένως παρατηρηθεί, που αφορούν την τοξικότητα ή την κινητική της. ελεγχόμενης χημικής ένωσης ή άλλων ομοειδών ουσιών. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης θα πρέπει να επιλέγεται με σκοπό την πρόκληση νευροτοξικών ή σαφών συστηματικών επιδράσεων. Στη συνέχεια, επιλέγεται μια φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσης με σκοπό τον προσδιορισμό της ενδεχόμενης σχέσης δόσης-απόκρισης και του NOAEL/στη χαμηλότερη δόση. Οι δόσεις θα πρέπει καταρχήν να καθορίζονται κατά τρόπον ώστε να επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ πρωτογενών τοξικών επιδράσεων στο νευρικό σύστημα και συστηματικής τοξικότητας. Δύο έως τρία επίπεδα δόσης είναι συχνά η καλύτερη λύση, ενώ είναι προτιμότερο να προστίθεται μια τέταρτη ομάδα αγωγής αντί να διαφέρουν τα επίπεδα πολύ μεταξύ τους (π.χ. διαφορά μεγαλύτερη από 1 προς 10). Εάν υπάρχει βάσιμη εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου, θα πρέπει να λαμβάνεται και αυτή υπόψη.

1.5.5 **Οριακή δοκιμή**

Εάν σε μελέτη με δόση τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, με εφαρμογή των διαδικασιών που περιγράφονται στα προηγούμενα, δεν παρατηρηθούν εμφανείς νευροτοξικές επιδράσεις και εφόσον δεν αναμένεται τοξικότητα με βάση στοιχεία για ουσίες ανάλογης χημικής δομής, τότε μπορεί να κριθεί περιττή η διεξαγωγή πλήρους μελέτης με τρεις διαφορετικές δόσεις. Η προβλεπόμενη έκθεση του ανθρώπου ενδέχεται να δείχνει ότι είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί στην οριακή δοκιμή υψηλότερη δόση από το στόμα. Σε περίπτωση χορήγησης από άλλη οδό, όπως εισπνοή ή εφαρμογή στο δέρμα, το μέγιστα εφικτό επίπεδο έκθεσης μπορεί να εξαρτάται από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας. Για τη χρήση της μεθόδου σε μελέτη οξείας τοξικότητας, η δόση στην οριακή δοκιμή θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 2000 mg/kg.

1.5.6 **Χορήγηση των δόσεων**

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται στα ζώα κάθε ημέρα της εβδομάδας για περίοδο τουλάχιστον 28 ημερών. Η χρήση πενθήμερου δοσολογικού σχήματος ή μικρότερης περιόδου έκθεσης πρέπει να αιτιολογείται. Σε περίπτωση χορήγησης της ελεγχόμενης ουσίας με σωλήνα, αυτή χορηγείται εφάπαξ με τη βοήθεια ρινογαστρικού καθετήρα σίτισης ή κατάλληλου σωλήνα διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν πρέπει κατά κανόνα να υπερβαίνει το 1ml/100g βάρους σώματος, αλλά στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων μπορεί να μελετηθεί το ενδεχόμενο χορήγησης 2 ml/-100g βάρους σώματος. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες, των οποίων οι επιδράσεις συνήθως ενισχύονται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση, η διακύμανση του όγκου των δόσεων θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με αλλαγή της συγκέντρωσης, ώστε ο όγκος να παραμένει σταθερός σε όλα τα επίπεδα δόσης.

Σε περίπτωση χορήγησης της ουσίας με την τροφή ή το νερό, είναι σημαντικό να διασφαλίζεται ότι οι χρησιμοποιούμενες ποσότητες ελεγχόμενης ουσίας δεν παρεμποδίζουν τη φυσιολογική θρέψη των ζώων ή το μεταβολισμό του νερού. Όταν η ουσία χορηγείται με την τροφή, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί είτε μια σταθερή συγκέντρωση στο σιτηρέσιο (ppm) είτε ένα σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το βάρος του ζώου. Η επιλεγόμενη εναλλακτική δυνατότητα πρέπει να προσδιορίζεται. Στην περίπτωση των ουσιών που χορηγούνται με σωλήνα σίτισης, οι δόσεις θα πρέπει να χορηγούνται την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα και να αναπροσαρμόζονται ανάλογα με το βάρος του ζώου, ώστε το επίπεδό τους να διατηρείται σταθερό. Στις περιπτώσεις όπου διεξάγεται μια βραχεία μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης ως προκαταρτική μακροχρόνιας μελέτης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται παρόμοιο σιτηρέσιο και στις δύο. Στην περίπτωση των μελετών οξείας τοξικότητας, εάν η εφάπαξ χορήγηση δεν είναι εφικτή, η δόση μπορεί να χορηγηθεί τμηματικά εντός περιόδου που δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες.

▼B

1.6 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ

1.6.1 **Συχνότητα παρατήρησης και εξετάσεων**

Στις μελέτες επαναλαμβανόμενης δόσης η περίοδος παρατήρησης θα πρέπει να καλύπτει την περίοδο δοσολογίας. Στις μελέτες οξείας τοξικότητας θα πρέπει να εφαρμόζεται περίοδος παρατήρησης 14 ημερών μετά την αγωγή. Όταν χρησιμοποιούνται δορυφορικές ομάδες ζώων που δεν εκτίθενται στην ουσία για ένα ορισμένο διάστημα μετά την αγωγή, οι παρατηρήσεις θα πρέπει να καλύπτουν και αυτό το διάστημα.

Η συχνότητα παρατήρησης θα πρέπει να είναι επαρκής, ώστε να μεγιστοποιείται η πιθανότητα ανίχνευσης διαταραχών της συμπεριφοράς ή/και νευρολογικών. Τα ζώα θα πρέπει κατά προτίμηση να εξετάζονται την ίδια ώρα κάθε ημέρα, λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Η συχνότητα κλινικής παρατήρησης και λειτουργικής εξέτασης συνοψίζεται στον πίνακα 2. Εάν δεδομένα κινητικής ή άλλα, προερχόμενα από προηγούμενη μελέτη, επιβάλλουν την επιλογή διαφορετικών χρόνων για τις παρατηρήσεις, τις εξετάσεις και τις διαδικασίες μετά την παρατήρηση, μπορεί να καθοριστεί διαφορετικό χρονοδιάγραμμα, ώστε να συγκεντρωθούν όσο το δυνατόν περισσότερα στοιχεία. Οι αλλαγές στο χρονοδιάγραμμα θα πρέπει να αιτιολογούνται.

1.6.1.1 *Παρατήρηση της γενικής κατάστασης της υγείας και της θνησιμότητας/νοσηρότητας*

Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, όσον αφορά τη γενική κατάσταση της υγείας τους, και τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως, όσον αφορά τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα.

1.6.1.2 *Λεπτομερής κλινική εξέταση*

Όλα τα ζώα που επιλέγονται για λεπτομερή κλινική εξέταση (βλέπε πίνακα 1) θα πρέπει να εξετάζονται μία φορά πριν από την πρώτη έκθεση (ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των υποκειμένων) και κατόπιν σε διάφορα διαστήματα ανάλογα με τη διάρκεια της μελέτης (βλέπε πίνακα 2). Η λεπτομερής κλινική εξέταση των δορυφορικών ομάδων ανάρρωσης θα πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου ανάρρωσης. Η λεπτομερής κλινική εξέταση θα πρέπει να διενεργείται έξω από το κλουβί, σε τυποποιημένο χώρο. Οι κλινικές παρατήρησης θα πρέπει να καταγράφονται με προσοχή, με τη βοήθεια ενός συστήματος βαθμολόγησης, που περιλαμβάνει κριτήρια ή βαθμολογική κλίμακα για κάθε ποσοτική εκτίμηση. Τα χρησιμοποιούμενα κριτήρια ή κλίμακες πρέπει να έχουν οριστεί επακριβώς από το εργαστήριο δοκιμών. Θα πρέπει να καταβάλλεται προσπάθεια, ώστε οι μεταβολές των συνθηκών δοκιμής (πλην εκείνων που συνδέονται συστηματικά με την αγωγή) να περιορίζονται στο ελάχιστο και η εξέταση να εκτελείται από έμπειρους εξεταστές, που δεν γνωρίζουν την αγωγή στην οποία έχουν υποβληθεί τα ζώα.

Συνιστάται η εξέταση να είναι δομημένη, με τρόπο ώστε καλά καθορισμένα κριτήρια (μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται ο καθορισμός του εύρους «φυσιολογικών τιμών»), να εφαρμόζονται συστηματικά σε κάθε ζώο και σε κάθε χρόνο παρατήρησης. Οι «φυσιολογικές τιμές» πρέπει να είναι επαρκώς τεκμηριωμένες. Καταγράφονται όλα τα παρατηρούμενα συμπτώματα και, εάν είναι εφικτό, η έντασή τους. Οι κλινικές παρατηρήσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν, χωρίς η απαρίθμηση να είναι περιοριστική, τις αλλαγές στο δέρμα, στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, την εμφάνιση εκκρίσεων και την αυτόνομη λειτουργία (π.χ., δακρύρροια, ανόρθωση του τριχώματος, αλλαγή του μεγέθους της κόρης των οφθαλμών, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής ή/και αναπνοή από το στόμα, ανωμαλίες στην ούρηση και στις κενώσεις, αποχρωματισμός των ούρων).

▼B

Θα πρέπει επίσης να σημειώνονται οι ασυνήθεις παρατηρήσεις που αφορούν τη θέση του σώματος, την κινητικότητα (π.χ. αύξηση ή μείωση της διάθεσης εξερεύνησης του τυποποιημένου χώρου) και το συντονισμό των κινήσεων. Θα *πρέπει* να καταγράφονται ακόμη οι αλλαγές στη βάδιση (π.χ. ταλάντευση, αταξία), στη στάση του σώματος (π.χ. κύρτωση της ράχης) και στην αντίδραση στη μεταχείριση, την τοποθέτηση και σε άλλα ερεθίσματα από το περιβάλλον, καθώς και η εμφάνιση μυοκλωνίας, υπερτονίας, σπασμών, τρόμου και στερεότυπων κινήσεων (π.χ. υπερβολική περιποίηση του σώματος, ασυνήθεις κινήσεις του κεφαλιού, διαγραφή συνεχών κύκλων), η περίεργη συμπεριφορά (π.χ. δήγματα ή υπερβολική λείξη, αυτοακρωτηριασμός, οπισθοδρόμηση, φώνηση) και η επιθετικότητα.

1.6.1.3 *Λειτουργικές εξετάσεις*

Όπως και στην περίπτωση της λεπτομερούς κλινικής εξέτασης, όλα τα ζώα που επιλέγονται για λειτουργικές εξετάσεις θα πρέπει να εξετάζονται μία φορά πριν από την έκθεση και, κατόπιν, τακτικά (βλέπε πίνακα 1). Η συχνότητα των λειτουργικών εξετάσεων εξαρτάται και αυτή από τη διάρκεια της μελέτης (βλέπε πίνακα 2). Εκτός από τις περιόδους παρατήρησης που καθορίζονται στον πίνακα 2, οι δορυφορικές ομάδες ανάρρωσης θα πρέπει επίσης να υποβάλλονται σε λειτουργικές εξετάσεις, όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο χρόνο θανάτωσης. Οι λειτουργικές εξετάσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν εκτίμηση των διαφόρων τρόπων αισθητικότητας [π.χ. ακοής, όρασης και ιδιοδεκτικής αισθητικότητας(5)(6)(7)], εκτίμηση της ισχύος των άκρων (8) και της κινητικότητας (9). Η κινητικότητα θα πρέπει να μετράται με αυτόματη συσκευή, ικανή να ανιχνεύει τόσο τη μείωση, όσο και την αύξησή της. Εφόσον χρησιμοποιείται άλλο σύστημα μέτρησης, θα πρέπει να παρέχει ποσοτικά δεδομένα και να διαθέτει αποδεδειγμένη ευαισθησία και αξιοπιστία. Κάθε συσκευή θα πρέπει να ελέγχεται για να διασφαλίζεται η αξιοπιστία στο χρόνο και η συνέπεια μεταξύ των συσκευών. Περισσότερες λεπτομέρειες για τις διαδικασίες που μπορούν να εφαρμόζονται, παρέχονται στη σχετική βιβλιογραφία. Εάν δεν υπάρχουν δεδομένα για πιθανές νευροτοξικές επιδράσεις (π.χ. σχέση δομής-δραστικότητας, επιδημιολογικά δεδομένα, αποτελέσματα άλλων τοξικολογικών μελετών), θα πρέπει να μελετάται το ενδεχόμενο προσθήκης πιο εξειδικευμένων εξετάσεων για αισθητικότητα και κινητικότητα ή για τις λειτουργίες της μάθησης και της μνήμης με σκοπό τη λεπτομερέστερη διερεύνηση των πιθανών επιδράσεων. Περισσότερες πληροφορίες για τις εν λόγω ειδικές εξετάσεις και τη χρήση τους παρέχονται στη δημοσίευση (1).

Κατ' εξαίρεση, τα ζώα που παρουσιάζουν συμπτώματα τοξικότητας σε βαθμό ώστε αυτά να παρεμποδίζουν τις λειτουργικές εξετάσεις, μπορούν να παραλείπονται. Η απόσυρση ζώων από μια λειτουργική εξέταση θα πρέπει να αιτιολογείται.

1.6.2 **Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής/νερού**

Στις μελέτες διάρκειας έως 90 ημερών, θα πρέπει να ζυγίζονται όλα τα ζώα τουλάχιστον ανά εβδομάδα και να μετράται η κατανάλωση τροφής (κατανάλωση νερού, εάν η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται μέσω αυτού) επίσης τουλάχιστον ανά εβδομάδα. Στις μακροχρόνιες μελέτες, θα πρέπει να ζυγίζονται όλα τα ζώα τουλάχιστον ανά εβδομάδα για τις πρώτες 13 εβδομάδες και, κατόπιν, τουλάχιστον ανά 4 εβδομάδες. Η κατανάλωση τροφής (κατανάλωση νερού, εάν η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται μέσω αυτού) θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον ανά εβδομάδα για τις πρώτες 13 εβδομάδες και, κατόπιν, ανά τρίμηνο περίπου, εκτός εάν η κατάσταση της υγείας ή οι μεταβολές του βάρους των ζώων επιβάλλουν άλλη συχνότητα.

▼B

1.6.3 **Οφθαλμολογία**

Στις μελέτες διάρκειας, άνω των 28 ημερών, πρέπει να υποβάλλονται σε οφθαλμολογική εξέταση, με οφθαλμοσκόπιο ή άλλο κατάλληλο όργανο, αν όχι όλα τα ζώα, τουλάχιστον εκείνα της ομάδας υψηλής δόσης και της ομάδας μάρτυρα πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και στο τέλος της μελέτης. Εφόσον διαπιστώνονται αλλαγές στους οφθαλμούς ή εάν το επιβάλλουν τα κλινικά συμπτώματα, θα πρέπει να εξετάζονται όλα τα ζώα. Στις μακροχρόνιες μελέτες, θα πρέπει επίσης να διενεργείται οφθαλμολογική εξέταση μετά 13 εβδομάδες. Δεν απαιτείται οφθαλμολογική εξέταση εάν υπάρχουν ήδη σχετικά δεδομένα από άλλες μελέτες με ανάλογη διάρκεια και ανάλογα επίπεδα δόσης.

1.6.4 **Αιματολογία και κλινική βιοχημεία**

Στις περιπτώσεις όπου η μελέτη νευροτοξικότητας διεξάγεται σε συνδυασμό με μελέτη συστηματικής τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης, πρέπει να διενεργούνται οι αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις που καθορίζονται στη μέθοδο της συγκεκριμένης μελέτης συστηματικής τοξικότητας. Τα δείγματα θα πρέπει να συλλέγονται κατά τρόπον ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές επιδράσεις στη συμπεριφορά του νευρικού συστήματος.

1.6.5 **Ιστοπαθολογία**

Η νευροπαθολογική εξέταση θα πρέπει να σχεδιάζεται για να συμπληρώνει και να διευρύνει τις παρατηρήσεις της φάσης *in vivo* της μελέτης. Ιστοί από τουλάχιστον 5 ζώα/φύλο/ομάδα (βλέπε πίνακα 1 και επόμενη παράγραφο) μονιμοποιούνται *in situ,* με τη βοήθεια αναγνωρισμένων τεχνικών έγχυσης και μονιμοποίησης (βλέπε δημοσίευση (3) κεφ. 5 και δημοσίευση (4) κεφ. 50). Όλες οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις θα πρέπει να καταγράφονται. Όταν η μελέτη διεξάγεται αυτοτελώς για τον αποκλεισμό ή μη της νευροτοξικότητας ή για το χαρακτηρισμό νευροτοξικών επιδράσεων, τα υπόλοιπα ζώα μπορούν να υποβληθούν σε ειδικές διαδικασίες μελέτης της συμπεριφοράς (10)(11) και σε νευροπαθολογικές (10ΧΠ)-(12)(13), νευροχημικές (10)(11)(14)(15) ή ηλεκτροφυσιολογικές (10)(11)(16)(17) εξέτασης, οι οποίες συμπληρώνουν τις διαδικασίες και εξετάσεις που περιγράφονται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή, ή να προστεθούν στον αριθμό των υποκειμένων της ιστοπαθολογικής εξέτασης. Οι συμπληρωματικές αυτές διαδικασίες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στις περιπτώσεις όπου εμπειρικές παρατηρήσεις ή οι αναμενόμενες επιδράσεις υποδεικνύουν ένα συγκεκριμένο τύπο ή στόχο νευροτοξικότητας (2)(3). Μια άλλη δυνατότητα είναι η χρήση των υπόλοιπων ζώων για τις παθολογικές εκτιμήσεις ρουτίνας που απαιτούν οι μέθοδοι δοκιμών επαναλαμβανόμενης δόσης.

Μετά από στερέωση σε παραφίνη, όλα τα ιστοτεμάχια βάφονται με χρώση γενικής χρήσεως, όπως αιματοξυλίνη και ηωσίνη (H&E), και ακολουθεί μικροσκοπική εξέταση. Εάν υπάρχουν συμπτώματα ή υπόνοιες περιφερειακής νευροπάθειας, θα πρέπει να εξετάζονται δείγματα περιφερειακών νεύρων, στερεωμένα σε πλαστική ύλη. Τα κλινικά συμπτώματα ενδέχεται επίσης να συνηγορούν υπέρ της εξέτασης πρόσθετων θέσεων ή της χρήσης ειδικών χρώσεων. Οδηγίες για πρόσθετες θέσεις προς εξέταση παρέχονται στις δημοσιεύσεις (3)(4). Χρήσιμες είναι επίσης οι ειδικές χρώσεις που αποκαλύπτουν συγκεκριμένους τύπους παθολογικών αλλοιώσεων (18).

▼B

Η ιστολογική εξέταση πρέπει να καλύπτει αντιπροσωπευτικές τομές του κεντρικού και του περιφερειακού νευρικού συστήματος (βλέπε δημοσίευση (3) κεφ. 5 και δημοσίευση (4) κεφ. 50). Οι εξεταζόμενες περιοχές κατά κανόνα περιλαμβάνουν τον προσεγκέφαλο, τον διεγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένης μιας τομής διαμέσου του ιπποκάμπου, τον μεσεγκέφαλο, την παρεγκεφαλίδα, τη γέφυρα, τον προμήκη μυελό, τον οφθαλμό με το οπτικό νεύρο και τον αμφιβληστροειδή, το νωτιαίο μυελό στο ύψος του αυχενικού και του οσφυϊκού ογκώματος, τα γάγγλια ραχιαίας ρίζας, τις ίνες ραχιαίας και κοιλιακής ρίζας, το πρώτο ισχιακό νεύρο, το πρώτο κνημιαίο νεύρο (στο γόνατο) και τους κλάδους του κνημιαίου νεύρου στον γαστροκνήμιο μυ. Οι τομές νωτιαίου μυελού και περιφερειακών νεύρων θα πρέπει να είναι διασταυρούμενες και εγκάρσιες και διαμήκεις. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή στην αγγείωση του νευρικού συστήματος. Θα πρέπει επίσης να εξετάζεται ένα δείγμα σκελετικού μυός, ιδίως του γαστροκνήμιου. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτούν οι θέσεις του κεντρικού και του περιφερειακού νευρικού συστήματος με κυτταρική και ινώδη δομή, που είναι γνωστό ότι προσβάλλονται ιδιαίτερα από τα νευροτοξικά.

Οδηγίες για τυπικές νευροπαθολογικές αλλοιώσεις που οφείλονται σε έκθεση σε τοξικούς παράγοντες παρέχονται στις δημοσιεύσεις (3)(4). Για την ιστολογική εξέταση συνιστάται κλιμακωτή διαδικασία, η οποία αρχίζει με σύγκριση των τομών που προέρχονται από την ομάδα υψηλής δόσης με τις τομές από την ομάδα μάρτυρα. Εάν δεν παρατηρηθούν νευροπαθολογικές αλλοιώσεις, δεν χρειάζεται άλλη εξέταση. Εάν παρατηρηθούν αλλοιώσεις στα δείγματα από την ομάδα υψηλής δόσης, όλα τα δείγματα πιθανώς προσβεβλημένων ιστών που προέρχονται από τις ομάδες μεσαίας και χαμηλής δόσης λαμβάνουν κωδικό αριθμό και εξετάζονται διαδοχικά.

Εάν η ποιοτική εξέταση δείξει νευροπαθολογικές αλλοιώσεις, όλες οι περιοχές του νευρικού συστήματος που εμφανίζουν τις εν λόγω αλλοιώσεις πρέπει να υποβληθούν σε δεύτερη εξέταση. Τομές από όλες τις πιθανώς προσβεβλημένες περιοχές, προερχόμενες από όλες τις δοσολογικές ομάδες, λαμβάνουν κωδικό αριθμό και εξετάζονται με τυχαία επιλογή, χωρίς γνώση του κωδικού αριθμού. Καταγράφονται η συχνότητα και η σοβαρότητα κάθε βλάβης. Μετά τη βαθμολόγηση όλων των περιοχών από όλες τις δοσολογικές ομάδες, είναι δυνατόν να αποκαλυφθεί η ταυτότητα των δειγμάτων και να ακολουθήσει στατιστική ανάλυση με σκοπό την εκτίμηση των σχέσεων δόσης-απόκρισης. Για κάθε βλάβη, θα πρέπει να περιγράφονται παραδείγματα των διαφόρων βαθμών σοβαρότητας.

Τα νευροπαθολογικά ευρήματα θα πρέπει να συσχετίζονται με τις παρατηρήσεις και μετρήσεις της συμπεριφοράς, καθώς και με άλλα δεδομένα από προηγούμενες ή ταυτόχρονες μελέτες συστηματικής τοξικότητας με αντικείμενο την ελεγχόμενη ουσία.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Πρέπει να παρέχονται τα δεδομένα για κάθε ζώο χωριστά. Επιπλέον, το σύνολο των δεδομένων πρέπει να συνοψίζεται σε πίνακα, όπου θα εμφαίνονται, για κάθε ομάδα αγωγής και μάρτυρα, ο αριθμός ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, ο αριθμός ζώων που βρέθηκαν νεκρά στη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην υποφέρουν και ο χρόνος θανάτου ή ευθανασίας, ο αριθμός ζώων που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, περιγραφή αυτών των συμπτωμάτων, με αναφορά του χρόνου εκδήλωσης, της διάρκειας, του είδους και της σοβαρότητας των τοξικών- επιδράσεων, ο αριθμός ζώων που παρουσίασαν βλάβη(-ες), με αναφορά του είδους και της σοβαρότητας της/τους.

▼B

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα της μελέτης θα πρέπει να αξιολογούνται με κριτήρια τη συχνότητα, τη σοβαρότητα και το συσχέτιση των επιδράσεων στη συμπεριφορά, των νευροπαθολογικών επιδράσεων (επίσης, των νευροχημικών ή ηλεκτροφυσιολογικών επιδράσεων, εάν η μελέτη περιλάμβανε συμπληρωματικές εξετάσεις) και τυχόν άλλων δυσμενών επιδράσεων που παρατηρήθηκαν. Τα αριθμητικά αποτελέσματα θα πρέπει, όπου είναι δυνατόν, να αξιολογούνται με κατάλληλη και αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδο, η οποία πρέπει να επιλέγεται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— σύσταση (συμπεριλαμβάνονται η ισομερείωση, η καθαρότητα και οι φυσικές και χημικές ιδιότητες)

— στοιχεία ταυτότητας.

Φορέας (κατά περίπτωση):

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

Πειραματόζωα:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε·

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων·

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, εγκλιματισμό, σιτηρέσιο κλπ.·

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες για το τύπο της ελεγχόμενης ουσίας/παρασκεύασμα σιτηρεσίου, τη συγκέντρωση που επιτεύχθηκε, τη σταθερότητα και την ομοιογένειά του·

— προδιαγραφές των δόσεων που χορηγήθηκαν, με λεπτομέρειες για το φορέα, τον όγκο και τη φυσική μορφή του υλικού που χορηγήθηκε·

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας·

— αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης·

— αιτιολόγηση της οδού και της διάρκειας έκθεσης·

— μετατροπή από συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στο σιτηρέσιο/πόσιμο νερό (ppm) σε πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εάν έχει εφαρμογή·

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Διαδικασίες παρατήρησης και δοκιμών:

— λεπτομέρειες για την επιλογή ζώων από κάθε ομάδα για έγχυση·

— λεπτομέρειες για τα συστήματα βαθμολόγησης, μεταξύ των οποίων κριτήρια και κλίμακες βαθμολόγησης για κάθε μέτρηση στο πλαίσιο της λεπτομερούς κλινικής εξέτασης·

▼B

— λεπτομέρειες για τις λειτουργικές εξετάσεις με σκοπό την εκτίμηση των διαφόρων τρόπων αισθητικότητας (π.χ. ακοής, όρασης και ιδιοδεκτικής αισθητικότητας), της ισχύος των άκρων και της κινητικότητας (με λεπτομερείς πληροφορίες για τις αυτόματες συσκευές μέτρησης της κινητικότητας), καθώς και για τυχόν άλλες διαδικασίες που εφαρμόστηκαν·

— λεπτομέρειες για τις οφθαλμολογικές εξετάσεις και, κατά περίπτωση, τις αιματολογικές και τις βιοχημικές αναλύσεις, με αναφορά των αντίστοιχων βασικών τιμών·

— λεπτομέρειες για τις ειδικές διαδικασίες μελέτης της συμπεριφοράς και ιστολογικές, νευροχημικές ή ηλεκτροφυσιολογικές εξετάσεις.

Αποτελέσματα:

— βάρη των ζώων με τις μεταβολές τους, συμπεριλαμβανομένου του βάρους κατά τη θανάτωση·

— κατανάλωση τροφής και νερού, κατά περίπτωση·

— δεδομένα για τις τοξικές αντιδράσεις κατά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένων των συμπτωμάτων τοξικότητας και της θνησιμότητας·

— φύση, σοβαρότητα και διάρκεια (χρόνος εκδήλωσης και εξέλιξη) των λεπτομερών κλινικών παρατηρήσεων (ανατάξιμων και μη)·

— λεπτομερή αναφορά των αποτελεσμάτων όλων των λειτουργικών εξετάσεων·

— ευρήματα από τη νεκροψία-νεκροτομία·

— λεπτομερή περιγραφή όλων των νευρολογικών, νευροπαθολογικών και νευροχημικών ή ηλεκτροφυσιολογικών ευρημάτων, εφόσον υπάρχουν·

— δεδομένα απορρόφησης και μεταβολισμού, εφόσον υπάρχουν·

— στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

— στοιχεία για τη σχέση δόσης-απόκρισης·

— συνεκτίμηση τυχόν άλλων τοξικών επιδράσεων για τη συναγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις νευροτοξικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας·

— επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις.

Συμπεράσματα:

— Συνιστάται να περιλαμβάνεται γνωμάτευση για τη συνολική νευροτοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

4 **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. ΟΟΣΑ, Παρίσι, υπό εκπόνηση

2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

5. Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

6. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9,691-704.

7. Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd; W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

10. Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11. Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12. Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.

14. O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

15. O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

16. Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.

17. Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.

18. Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Prance of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Πίνακας 1:

Ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός ζώων ανά ομάδα όταν η μελέτη νευροτοξικότητας διεξάγεται χωριστά ή σε συνδυασμό με άλλες μελέτες

	ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ:			
	αυτοτελώς	σε συνδυασμό με τη μελέτη 28 ημερών	σε συνδυασμό με τη μελέτη 90 ημερών	σε συνδυασμό με τη μελέτη χρόνιας τοξικότητας
Συνολικός αριθμός ζώων ανά ομάδα	10 αρσενικά και 10 θηλυκά	10 αρσενικά και 10 θηλυκά	15 αρσενικά και 15 θηλυκά	25 αρσενικά και 25 θηλυκά
Αριθμός ζώων για λειτουργικές εξετάσεις, που περιλαμβάνουν λεπτομερή(-είς) κλινική(-ές) παρατηρήσεις	10 αρσενικά και 10 θηλυκά	10 αρσενικά και 10 θηλυκά	10 αρσενικά και 10 θηλυκά	10 αρσενικά και 10 θηλυκά
Αριθμός ζώων για έγχυση και νευροϊστοπαθολογίκή εξέταση	5 αρσενικά και 5 θηλυκά	5 αρσενικά και 5 θηλυκά	5 αρσενικά και 5 θηλυκά	5 αρσενικά και 5 θηλυκά
Αριθμός ζώων για παρατήρηση και αιματολογικές, βιοχημικές, ιστοπαθολογικές και λοιπές εξετάσεις σε μελέτη τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης/υποχρόνιας/χρόνιας, όπως υποδεικνύεται στις αντίστοιχες *Κατευθυντήριες γραμμές*		5 αρσενικά και 5 θηλυκά	10 αρσενικά † και 10 θηλυκά †	20 αρσενικά † και 20 θηλυκά †
Συμπληρωματικές παρατηρήσεις, κατά περίπτωση	5 αρσενικά και 5 θηλυκά			

† Συμπεριλαμβάνονται τα πέντε ζώα που έχουν επιλεγεί για λειτουργικές εξετάσεις και λεπτομερή κλινική εξέταση στο πλαίσιο της μελέτης νευροτοξικότητας.

▼B

Πίνακας 2:

Συχνότητα της κλινικής παρατήρησης και των λειτουργικών εξετάσεων

Είδος εξέτασης		Μελέτη			
		οξείας τοξικότητας	28 ημερών	90 ημερών	χρόνιας τοξικότητας
Όλα τα ζώα	Γενική κατάσταση της υγείας	μία φορά ημερησίως	μία φορά ημερησίως	μία φορά ημερησίως	μία φορά ημερησίως
	Θνησιμότητα/νοσηρότητα	δύο φορές ημερησίως	δύο φορές ημερησίως	δύο φορές ημερησίως	δύο φορές ημερησίως
Ζώα που έχουν επιλεγεί για λειτουργικές εξετάσεις	Λεπτομερής(-είς) κλινική(-ές) παρατηρήσεις	— πριν από την πρώτη έκθεση — εντός 8 ωρών από τη χορήγηση της δόσης, κατά τον προβλεπόμενο χρόνο κορύφωσης της επίδρασης — την 7η και 14η ημέρα από τη χορήγηση της δόσης	— πριν από την πρώτη έκθεση — κατόπιν, ανά εβδομάδα	— πριν από την πρώτη έκθεση — μία φορά κατά την πρώτη ή δεύτερη εβδομάδα έκθεσης — κατόπιν, ανά μήνα	— πριν από την πρώτη έκθεση — μία φορά στο τέλος του πρώτου μήνα έκθεσης — κατόπιν, ανά τρεις μήνες
	Λειτουργικές εξετάσεις	— πριν από την πρώτη έκθεση — εντός 8 ωρών από τη χορήγηση της δόσης, κατά τον προβλεπόμενο χρόνο κορύφωσης της επίδρασης — την 7η και 14η ημέρα από τη χορήγηση της δόσης	— πριν από την πρώτη έκθεση — στη διάρκεια της τέταρτης εβδομάδας της αγωγής, όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο τέλος της περιόδου έκθεσης	— πριν από την πρώτη έκθεση — μία φορά κατά την πρώτη ή δεύτερη εβδομάδα έκθεσης — κατόπιν, ανά μήνα	— πριν από την πρώτη έκθεση — μία φορά στο τέλος του πρώτου μήνα έκθεσης — κατόπιν, ανά τρεις μήνες

▼B

B.44. **ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ: ΜΕΘΟΔΟΣ *IN VIVO***

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 427 (2004) του ΟΟΣΑ.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ενώ η έκθεση σε πολλές χημικές ουσίες συντελείται κυρίως μέσω του δέρματος, εν τούτοις στις περισσότερες τοξικολογικές μελέτες που διεξάγονται σε πειραματόζωα η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα. Η μελέτη διαδερμικής απορρόφησης *in vivo*, που περιγράφεται στην παρούσα κατευθυντήρια γραμμή, παρέχει τον απαραίτητο συνδετικό κρίκο για την παρέκταση των δεδομένων από μελέτες χορήγησης από το στόμα, όταν εκτιμάται η ασφάλεια μετά από δερματική έκθεση.

Για να μπορέσει μια ουσία να εισχωρήσει στην κυκλοφορία του αίματος, πρέπει προηγουμένως να διασχίσει πολλές κυτταρικές στιβάδες του δέρματος. Για τις περισσότερες ουσίες, η στιβάδα που καθορίζει την ταχύτητα απορρόφησης είναι η κερατίνη στιβάδα, η οποία αποτελείται από νεκρά κύτταρα. Η διαπερατότητα μέσω του δέρματος εξαρτάται, αφενός από το κατά πόσον η χημική ουσία είναι λιπόφιλη και, αφετέρου από το πάχος της εξωτερικής στιβάδας της επιδερμίδας, καθώς και από παράγοντες όπως το μοριακό βάρος και η συγκέντρωση της ουσίας. Γενικά, το δέρμα των επιμύων και των κουνελιών είναι πιο διαπερατό από του ανθρώπου, ενώ η διαπερατότητα του δέρματος των ινδικών χοιριδίων και των πιθήκων είναι παραπλήσια με εκείνη του ανθρώπου.

Οι μέθοδοι μέτρησης της διαδερμικής απορρόφησης υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες: *in vivo* και *in vitro*. Η μέθοδος *in vivo* είναι ικανή να παρέχει ικανοποιητικά στοιχεία σχετικά με τη δερματική απορρόφηση σε διάφορα είδη πειραματόζωων. Οι μέθοδοι *in vitro* αναπτύχθηκαν πιο πρόσφατα και βασίζονται στη μεταφορά προς ένα ρευστό υποδοχής διαμέσου ζωικού ή ανθρώπινου δέρματος πλήρους ή ελαττωμένου πάχους. Η μέθοδος *in vitro* περιγράφεται σε χωριστή μέθοδο δοκιμών (1). Για την επιλογή της πιο ενδεδειγμένης μεθόδου σε μια δεδομένη περίπτωση, συνιστάται να χρησιμοποιείται ως βοήθημα το καθοδηγητικό έγγραφο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή μελετών δερματικής απορρόφησης (2), δεδομένου ότι παρέχει λεπτομερέστερες πληροφορίες σχετικά με την καταλληλότητα και των δύο κατηγοριών μεθόδων, *in vivo* και *in vitro*.

Με τη μέθοδο *in vivo* που περιγράφεται στο παρόν έγγραφο είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η διείσδυση της ελεγχόμενης ουσίας στο συστηματικό διαμέρισμα μέσω του δέρματος. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως από πολλών ετών (3)(4)(5)(6)(7). Οι μελέτες διαδερμικής απορρόφησης *in vitro* μπορεί να ενδείκνυνται σε πολλές περιπτώσεις, εν τούτοις όμως υπάρχουν καταστάσεις όπου μόνο μια μελέτη *in vivo* μπορεί να προσφέρει τα αναγκαία δεδομένα.

Η μέθοδος *in vivo* πλεονεκτεί κατά το ότι χρησιμοποιούνται ένα άθικτο από φυσιολογική και μεταβολική άποψη σύστημα και ένα είδος ζώου κοινό σε πολλές μελέτες τοξικότητας και ότι μπορεί να τροποποιηθεί, προκειμένου να εφαρμοστεί σε άλλα είδη ζώων. Τα μειονεκτήματά της συνίστανται στη χρήση ζωντανών ζώων, στην ανάγκη χρήσης ραδιοσημασμένου υλικού για να διευκολυνθεί η λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων, στις δυσχέρειες του προσδιορισμού του πρώιμου σταδίου απορρόφησης και στις διαφορές ως προς τη διαπερατότητα του δέρματος μεταξύ του προτιμώμενου ζωικού είδους (επίμυς) και του ανθρώπου. Το δέρμα των ζώων είναι γενικά πιο διαπερατό, με αποτέλεσμα την ενδεχόμενη υπερεκτίμηση της διαδερμικής απορρόφησης στον άνθρωπο (6)(8)(9). Οι καυστικές/διαβρωτικές ουσίες δεν θα πρέπει να ελέγχονται σε ζωντανά ζώα.

▼B

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Μη απορροφώμενη δόση: αντιπροσωπεύει την ποσότητα που εκπλύνεται από την επιφάνεια του δέρματος μετά την έκθεση και τις ποσότητες που ενδεχομένως ανευρίσκονται στο διαπερατό επίθεμα, συμπεριλαμβανομένης της δόσης που ενδεχομένως αποδεικνύεται ότι εξατμίζεται από το δέρμα στη διάρκεια της έκθεσης.

Απορροφώμενη δόση (*in vivo*): περιλαμβάνει την ποσότητα που ανευρίσκεται στα ούρα, στα υγρά έκπλυσης του κλωβού, στα κόπρανα, στον εκπνεόμενο αέρα (εφόσον έχει μετρηθεί), στο αίμα, σε ιστούς (εφόσον έχουν ληφθεί) και στο υπόλοιπο του πτώματος του ζώου, μετά την αφαίρεση του δέρματος του σημείου εφαρμογής της δόσης.

Απορροφήσιμη δόση: αντιπροσωπεύει τη δόση που ανευρίσκεται στην επιφάνεια ή στη μάζα του δέρματος μετά από έκπλυση.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η ελεγχόμενη ουσία, κατά προτίμηση ραδιοσημασμένη, εφαρμόζεται στο αποτριχωμένο δέρμα των ζώων σε ένα ή περισσότερα κατάλληλα επίπεδα δόσης με τη μορφή αντιπροσωπευτικού, εν χρήσει παρασκευάσματος. Το ελεγχόμενο παρασκεύασμα αφήνεται σε επαφή με το δέρμα για καθορισμένο χρονικό διάστημα κάτω από κατάλληλο επίθεμα (διαπερατό, ημιπερατό ή στεγανό) για να αποφευχθεί η κατάποση του παρασκευάσματος. Στο τέλος του χρόνου έκθεσης, αφαιρείται το επίθεμα, καθαρίζεται το δέρμα με κατάλληλο προϊόν, το επίθεμα και τα υλικά καθαρισμού φυλάσσονται για ανάλυση και τοποθετείται νέο επίθεμα. Πριν και μετά την περίοδο έκθεσης, καθώς και στη διάρκειά της, τα ζώα στεγάζονται σε ατομικούς κλωβούς μεταβολισμού, από τους οποίους συλλέγονται για ανάλυση τα περιττώματα και ο εκπνεόμενος αέρας κατά τις εν λόγω περιόδους. Η συλλογή του εκπνεόμενου αέρα μπορεί να παραλείπεται στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν επαρκή στοιχεία, από τα οποία προκύπτει ότι σχηματίζονται ελάχιστες ή μηδενικές ποσότητες πτητικού ραδιενεργού μεταβολίτη. Κάθε μελέτη περιλαμβάνει κατά κανόνα έκθεση πολλών ομάδων ζώων στο ελεγχόμενο παρασκεύασμα. Τα ζώα μίας ομάδας θανατώνονται στο τέλος της περιόδου έκθεσης, ενώ εκείνα των άλλων ομάδων αργότερα, σε προγραμματισμένα χρονικά διαστήματα (2). Στο τέλος του χρόνου δειγματοληψίας, θανατώνονται τα εναπομένοντα ζώα, συλλέγεται αίμα για ανάλυση, αφαιρείται το δέρμα του σημείου εφαρμογής για ανάλυση και το πτώμα του ζώου υποβάλλεται σε ανάλυση για την ανίχνευση τυχόν υλών που δεν απεκκρίθηκαν. Τα δείγματα υποβάλλονται σε δοκιμασίες με τα ενδεδειγμένα μέσα και υπολογίζεται κατ' εκτίμηση ο βαθμός διαδερμικής απορρόφησης (6)(8)(9).

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1 **Επιλογή ζωικού είδους**

Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο είδος είναι ο επίμυς, αλλά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν φυλές και είδη χωρίς τρίχωμα, τα οποία παρουσιάζουν ρυθμούς δερματικής απορρόφησης πλησιέστερους προς εκείνους του ανθρώπου (3)(6)(7)(8)(9). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά ενήλικα υγιή ζώα του ίδιου φύλου (αρσενικά ως προκαθορισμένο από τη μέθοδο φύλο) από φυλές πειραματόζωων κοινής χρήσεως. Όταν αρχίζει η μελέτη, οι διαφορές βάρους μεταξύ των χρησιμοποιούμενων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το ± 20 % του μέσου βάρους. Για παράδειγμα, κατάλληλοι είναι αρσενικοί επίμυες βάρους 200 - 250 γραμμαρίων, ιδίως στο άνω ήμισυ αυτού του εύρους βαρών.

▼B

1.4.2 **Αριθμός και φύλο των ζώων**

Για κάθε ελεγχόμενο παρασκεύασμα και κάθε προγραμματισμένο χρόνο τερματισμού, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία ομάδα αποτελούμενη από τουλάχιστον τέσσερα ζώα του ίδιου φύλου. Κάθε ομάδα ζώων θανατώνεται μετά την πάροδο διαφορετικού χρονικού διαστήματος, λόγου χάριν στο τέλος της περιόδου έκθεσης (συνήθως 6 ή 24 ώρες) και μετέπειτα (π.χ. μετά 48 και 72 ώρες). Εάν υπάρχουν στοιχεία που καταδεικνύουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών ζώων ως προς τη δερματική τοξικότητα, θα πρέπει να επιλέγεται το πιο ευαίσθητο φύλο. Σε αντίθετη περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοδήποτε φύλο.

1.4.3 **Συνθήκες στέγασης και διατροφής**

Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 °C (±3 °C). Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12ώρου. Για τη διατροφή των ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται τα συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, τα οποία θα πρέπει να προσφέρονται σε αφθονία και με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Στη διάρκεια της μελέτης και, κατά προτίμηση, και του εγκλιματισμού, τα ζώα στεγάζονται σε ατομικούς κλωβούς μεταβολισμού. Δεδομένου ότι η διασπορά τροφής και η έκχυση νερού υπονομεύουν τα αποτελέσματα, θα πρέπει να ελαχιστοποιείται το ενδεχόμενο τέτοιων συμβάντων

1.4.4 **Προετοιμασία των ζώων**

Τα ζώα σημαίνονται για να είναι δυνατή η αναγνώριση του καθενός και παραμένουν στους κλωβούς τους πέντε ημέρες τουλάχιστον πριν από την έναρξη της μελέτης, ώστε να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου.

Μετά τη λήξη της περιόδου εγκλιματισμού και ένα 24ωρο περίπου πριν από την εφαρμογή της δόσης, αφαιρείται με κουρά το τρίχωμα ενός τμήματος του δέρματος κάθε ζώου στην περιοχή των ώμων και της ράχης. Οι ιδιότητες διαπερατότητας του δέρματος που έχει υποστεί βλάβη διαφέρουν σε σύγκριση με το άθικτο δέρμα και, για τον λόγο αυτό, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η εκδορά του δέρματος. Μετά την κουρά και ένα 24ωρο περίπου πριν από την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας στο δέρμα (βλέπε σημείο 1.4.7), η επιφάνεια του δέρματος πρέπει να σφουγγίζεται με ακετόνη για να απομακρυνθεί το σμήγμα. Δεν συνιστάται επιπλέον καθαρισμός με σαπούνι και νερό, επειδή τα ενδεχόμενα υπολείμματα σαπουνιού μπορούν να ενισχύσουν την απορρόφηση της ελεγχόμενης ουσίας. Η επιφάνεια δέρματος πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη, ώστε να επιτρέπει τον αξιόπιστο υπολογισμό της απορροφώμενης ποσότητας ελεγχόμενης χημικής ουσίας ανά cm^2 δέρματος, κατά προτίμηση 10 cm^2 τουλάχιστον. Αυτό είναι εφικτό με επίμυες βάρους 200-250 γραμμαρίων. Μετά την προετοιμασία, τα ζώα επαναφέρονται στους κλωβούς μεταβολισμού

1.4.5 **Ελεγχόμενη ουσία**

Η ελεγχόμενη ουσία συνίσταται στη χημική οντότητα, τα χαρακτηριστικά διείσδυσης της οποίας πρόκειται να μελετηθούν. Θεωρητικά, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να είναι ραδιοσημασμένη.

1.4.6 **Ελεγχόμενο παρασκεύασμα**

Το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. αναραίωτο, αραιωμένο ή μορφοποιημένο υλικό, το οποίο περιέχει την ελεγχόμενη ουσία και εφαρμόζεται στο δέρμα) θα πρέπει να είναι το ίδιο (ή ρεαλιστικό υποκατάστατο) με εκείνο στο οποίο μπορεί να εκτεθούν άνθρωποι ή άλλα πιθανά είδη στόχου. Κάθε διαφορά από το «εν χρήσει» παρασκεύασμα πρέπει να αιτιολογείται. Εάν είναι απαραίτητο, παρασκευάζονται διαλύματα ή εναιωρήματα της ελεγχόμενης ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Σε περίπτωση χρήσης άλλων φορέων πλην του νερού, θα πρέπει να είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά απορρόφησης και η πιθανή αλληλεπίδρασή τους με την ελεγχόμενη ουσία.

▼B

1.4.7 **Εφαρμογή στο δέρμα**

Ορίζεται σημείο εφαρμογής, με συγκεκριμένη έκταση, στην επιφάνεια του δέρματος. Στο σημείο αυτό εφαρμόζεται κατόπιν ομοιόμορφα γνωστή ποσότητα του ελεγχόμενου παρασκευάσματος. Η εν λόγω ποσότητα πρέπει κατά κανόνα να μιμείται την πιθανή έκθεση του ανθρώπου, συνήθως 1-5 mg/cm^2 δέρματος στην περίπτωση των στερεών και έως 10 ml/cm^2 προκειμένου για υγρά. Η ενδεχόμενη εφαρμογή άλλων ποσοτήτων θα πρέπει να δικαιολογείται από τις προβλεπόμενες συνθήκες χρήσης, τους στόχους της μελέτης ή από τα φυσικά χαρακτηριστικά του ελεγχόμενου παρασκευάσματος. Μετά την εφαρμογή, το σημείο αγωγής πρέπει να προστατεύεται από τις κινήσεις περιποίησης του ζώου. Παράδειγμα τυπικής διάταξης παρέχεται στο σχήμα 1. Το σημείο εφαρμογής προστατεύεται κατά κανόνα με μη στεγανό επίθεμα (π.χ. διαπερατό επίθεμα από γάζα νάιλον). Στις περιπτώσεις εφαρμογών επ' άπειρον, όμως, το σημείο εφαρμογής πρέπει να καλύπτεται αεροστεγώς. Εάν η εξάτμιση μερικώς πτητικών ελεγχόμενων ουσιών μειώνει το ποσοστό ανάκτησης της ελεγχόμενης ουσίας σε απαράδεκτο βαθμό (βλέπε επίσης σημείο 1.4.10 πρώτο εδάφιο), είναι απαραίτητη η παγίδευση της εξατμιζόμενης ουσίας με φίλτρο ζωικού άνθρακα, το οποίο καλύπτει τη διάταξη εφαρμογής (βλέπε σχήμα 1). Είναι σημαντικό να μην προκαλεί η διάταξη βλάβες στο δέρμα ούτε να απορροφά το ελεγχόμενο παρασκεύασμα ή να αντιδρά με αυτό. Τα ζώα επαναφέρονται στους ατομικούς κλωβούς μεταβολισμού για συλλογή των περιττωμάτων.

1.4.8 **Διάρκεια έκθεσης και δειγματοληψία**

Διάρκεια έκθεσης είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εφαρμογή του ελεγχόμενου παρασκευάσματος μέχρι την απομάκρυνσή του με έκπλυση του δέρματος. Θα πρέπει να επιλέγεται κατάλληλη περίοδος έκθεσης (συνήθως 6 ή 24 ώρες), με βάση την προβλεπόμενη διάρκεια της έκθεσης του ανθρώπου. Μετά την περίοδο έκθεσης, τα ζώα παραμένουν στους κλωβούς μεταβολισμού μέχρι τον προγραμματισμένο τερματισμό. Τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται για τον εντοπισμό σημείων τοξικότητας/αφύσικων αντιδράσεων σε τακτά διαστήματα σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης το δέρμα που υποβλήθηκε σε αγωγή θα πρέπει να παρατηρείται για τον εντοπισμό ορατών σημείων ερεθισμού.

Οι κλωβοί μεταβολισμού θα πρέπει να επιτρέπουν τη χωριστή συλλογή των ούρων και των κοπράνων σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Θα πρέπει επίσης να επιτρέπουν τη συλλογή διοξειδίου του άνθρακα 14C και πτητικών ενώσεων του άνθρακα 14C, τα οποία θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση, εάν παράγονται σε σημαντικές ποσότητες (πάνω από 5 %). Τα ούρα, τα κόπρανα και τα ρευστά της παγίδας (π.χ. διοξείδιο του άνθρακα 14C και πτητικές ενώσεις του άνθρακα 14C) θα πρέπει να συλλέγονται χωριστά από κάθε ομάδα σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Εάν υπάρχουν επαρκή στοιχεία, από τα οποία προκύπτει ότι σχηματίζονται ελάχιστες ή μηδενικές ποσότητες πτητικού ραδιενεργού μεταβολίτη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανοικτοί κλωβοί.

Στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, τα περιττώματα συλλέγονται 24 ώρες, το αργότερο, μετά την πρώτη επαφή με το δέρμα και, κατόπιν, καθημερινά μέχρι το τέλος του πειράματος. Κατά κανόνα, αρκούν τρία χρονικά διαστήματα συλλογής περιττωμάτων, αλλά η προβλεπόμενη χρήση του ελεγχόμενου παρασκευάσματος ή τα διαθέσιμα δεδομένα κινητικής ενδέχεται να υπαγορεύουν πιο ενδεδειγμένες ή πρόσθετες χρονικές στιγμές για μελέτη.

Στο τέλος της περιόδου έκθεσης αφαιρείται η προστατευτική διάταξη από κάθε ζώο και φυλάσσεται χωριστά για ανάλυση. Το υποβληθέν σε αγωγή δέρμα όλων των ζώων πρέπει να εκπλύνεται τουλάχιστον τρεις φορές με προϊόν καθαρισμού, με τη βοήθεια κατάλληλων βαμβακοφόρων στειλεών και με προσοχή, ώστε να μην μολύνονται άλλα μέρη του σώματος. Το προϊόν καθαρισμού θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό των συνήθων πρακτικών υγιεινής, π.χ. σαπούνι διαλυμένο σε νερό. Τέλος, το δέρμα θα πρέπει να στεγνώνεται. Όλοι οι βαμβακοφόροι στειλεοί και τα υγρά της έκπλυσης πρέπει να φυλάσσονται για ανάλυση. Στα ζώα των ομάδων που θα υποβληθούν σε ανάλυση σε μεταγενέστερες χρονικές στιγμές, πρέπει να τοποθετείται νέο επίθεμα για την προστασία του υποβληθέντος σε αγωγή σημείου, πριν επιστρέψουν στους ατομικούς κλωβούς.

▼B

1.4.9 **Διαδικασίες τερματισμού**

Τα ζώα κάθε ομάδας θα πρέπει να θανατώνονται την προγραμματισμένη χρονική στιγμή και να συλλέγεται αίμα για ανάλυση. Θα πρέπει να αφαιρείται το προστατευτικό επίθεμα ή διάταξη για ανάλυση. Το δέρμα του σημείου εφαρμογής, καθώς και ένα ανάλογης έκτασης τμήμα αποτριχωμένου δέρματος, στο οποίο δεν εφαρμόστηκε δόση, θα πρέπει να αφαιρούνται από κάθε ζώο για χωριστή ανάλυση. Το δέρμα του σημείου εφαρμογής μπορεί να διατμηθεί, προκειμένου να αποχωριστεί η κερατίνη στιβάδα από την υποκείμενη επιδερμίδα, ώστε να συγκεντρωθούν περισσότερα στοιχεία σχετικά με την κατανομή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Ο προσδιορισμός αυτής της κατανομής με την πάροδο κάποιου χρόνου από την περίοδο έκθεσης θα πρέπει να παρέχει ορισμένες ενδείξεις για την πορεία κάθε ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην κερατίνη στιβάδα. Για τη διευκόλυνση της διάτμησης του δέρματος (μετά την τελική έκπλυσή του και τη θανάτωση του ζώου), αφαιρείται κάθε προστατευτικό επίθεμα. Το δέρμα του σημείου εφαρμογής μαζί με έναν δακτύλιο περιβάλλοντος δέρματος εκτέμνεται από τον επίμυ και στερεώνεται σε πλάκα. Στην επιφάνεια του δέρματος τοποθετείται με ελαφρά πίεση ένα τεμάχιο κολλητικής ταινίας το οποίο, κατόπιν, αποκολλάται μαζί με μέρος της κερατίνης στιβάδας. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται με διαδοχικά τεμάχια κολλητικής ταινίας, μέχρις ότου αυτή δεν προσκολλάται πλέον στην επιφάνεια του δέρματος, αφού έχει απομακρυνθεί το σύνολο της κερατίνης στιβάδας. Για κάθε ζώο, όλα τα τεμάχια κολλητικής ταινίας μπορούν να συνενώνονται σε ένα δοχείο, στο οποίο προστίθεται μέσο πέψης ιστών για να διαλυθεί η κερατίνη στιβάδα. Αφού αφαιρεθεί ενδεχομένως κάθε πιθανός ιστός στόχου για χωριστή μέτρηση, το υπόλοιπο του πτώματος του ζώου υποβάλλεται σε ανάλυση για τον προσδιορισμό της δόσης που έχει απορροφήσει. Θα πρέπει να φυλάσσονται για ανάλυση τα πτώματα όλων των ζώων. Αρκεί συνήθως ο προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας. Είναι δυνατόν να αφαιρούνται όργανα στόχου για χωριστή ανάλυση (εάν αυτό υποδεικνύεται από άλλες μελέτες). Τα ούρα που περιέχονται στην ουροδόχο κύστη κατά το χρόνο της προγραμματισμένης θανάτωσης θα πρέπει να προστίθενται στην ποσότητα που έχει συλλεχθεί προηγουμένως. Μετά τη συλλογή των περιττωμάτων από τους κλωβούς μεταβολισμού κατά το χρόνο της προγραμματισμένης θανάτωσης, οι κλωβοί και οι παγίδες τους θα πρέπει να εκπλύνονται με κατάλληλο διαλύτη. Θα πρέπει να υποβάλλονται ομοίως σε ανάλυση τα άλλα σκεύη και όργανα που έχουν πιθανώς μολυνθεί.

1.4.10 **Ανάλυση**

Σε όλες τις μελέτες θα πρέπει να επιτυγχάνεται επαρκής ανάκτηση (δηλ. μέσος όρος 100 ± 10 % της ραδιενέργειας) Τα εκτός του πεδίου αυτού ποσοστά ανάκτησης πρέπει να αιτιολογούνται. Η ποσότητα της χορηγηθείσας δόσης σε κάθε δείγμα θα πρέπει να προσδιορίζεται με δεόντως επικυρωμένες διαδικασίες.

Οι στατιστικές εκτιμήσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν μέτρο της διασποράς για τα πολλαπλά δείγματα σε κάθε εφαρμογή.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Οι κατωτέρω μετρήσεις θα πρέπει να εκτελούνται για κάθε ζώο, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας για την ελεγχόμενη χημική ουσία ή/και τους μεταβολίτες της. Επιπλέον των ατομικών δεδομένων, θα πρέπει να αναφέρονται, ως μέσοι όροι, δεδομένα χωρισμένα σε ομάδες ανάλογα με το χρόνο δειγματοληψίας.

— ποσότητα που συνδέεται με τις προστατευτικές διατάξεις·

— ποσότητα που μπορεί να απομακρυνθεί από το δέρμα·

— ποσότητα που ανευρίσκεται στη μάζα/επιφάνεια του δέρματος και δεν μπορεί να εκπλυθεί από αυτό·

▼B

— ποσότητα στο δείγμα αίματος·

— ποσότητα στα περιττώματα και στον εκπνεόμενο αέρα (κατά περίπτωση)·

— ποσότητα που παρέμεινε στο πτώμα του ζώου και στα όργανα τα οποία ενδεχομένως αφαιρέθηκαν για να υποβληθούν σε χωριστή ανάλυση.

Από την ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας ή/και μεταβολιτών που ανευρίσκεται στα περιττώματα, στον εκπνεόμενο αέρα, στο αίμα και στο πτώμα του ζώου είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η συνολική ποσότητα που απορροφήθηκε σε κάθε χρονική στιγμή. Είναι επίσης δυνατόν να υπολογιστεί η ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας που απορροφήθηκε ανά cm^2 δέρματος, το οποίο εκτέθηκε σε αυτήν, στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1 ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να καλύπτει τις απαιτήσεις που ορίζονται στο πρωτόκολλο, μεταξύ των οποίων η αιτιολόγηση της χρήσης του συστήματος δοκιμής, και να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS, εφόσον είναι γνωστός, προέλευση, καθαρότητα [ραδιοχημική καθαρότητα], γνωστές ξένες προσμίξεις, αριθ. παρτίδας)·

— φυσική υπόσταση, φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. pH, πτητικότητα, διαλυτότητα, σταθερότητα, μοριακό βάρος και log Pow [συντελεστής κατανομής σε μίγμα οκτανόλης/νερού]).

Ελεγχόμενο παρασκεύασμα:

— μορφοποίηση και αιτιολόγηση της χρήσης του·

— λεπτομέρειες για το ελεγχόμενο παρασκεύασμα, εφαρμοσθείσα ποσότητα, επιτευχθείσα συγκέντρωση, φορέας, σταθερότητα και ομοιογένεια.

Πειραματόζωα ελέγχου:

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε·

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσια κλπ.·

— βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες για τη χορήγηση του ελεγχόμενου παρασκευάσματος (σημείο εφαρμογής, μέθοδοι δοκιμασίας, στεγανό/διαπερατό επίθεμα, όγκος, εκχύλιση, ανίχνευση)·

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Αποτελέσματα:

— τυχόν σημεία τοξικότητας·

— δεδομένα για την απορρόφηση, σε μορφή πίνακα (εκφραζόμενη σε ταχύτητα, ποσότητα ή ποσοστό επί τοις εκατό)·

▼B

— συνολική ανάκτηση στο πείραμα·

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων, σύγκριση με τυχόν διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με τη διαδερμική απορρόφηση της ελεγχόμενης χημικής ένωσης.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Μέθοδος δοκιμών Β.45. Δερματική απορρόφηση: μέθοδος *in vitro*.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol*. 8(5), 829-835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

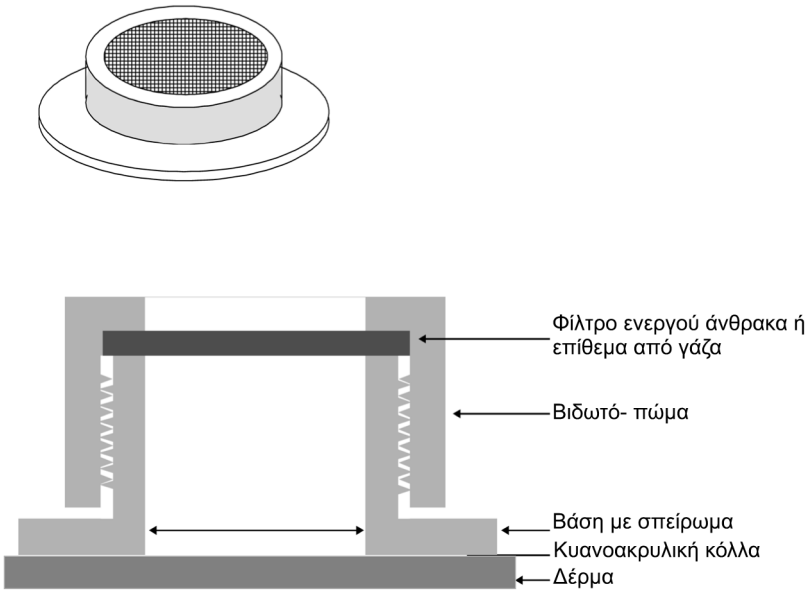
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, 369-373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, 399-404.

▼B

Σχήμα 1

Παράδειγμα σχεδίου τυπικής διάταξης που χρησιμοποιείται για την οριοθέτηση και την προστασία του σημείου εφαρμογής στο δέρμα κατά τις μελέτες διαδερμικής απορρόφησης *in vivo*



▼B

B.45. ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ: ΜΕΘΟΔΟΣ *IN VITRO*

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 428 (2004) του ΟΟΣΑ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος σχεδιάστηκε για να παρέχει στοιχεία σχετικά με την απορρόφηση μιας ελεγχόμενης ουσίας που εφαρμόζεται σε εκτετμημένο δέρμα. Μπορεί είτε να συνδυαστεί με τη μέθοδο δερματικής απορρόφησης *in vivo* (1) είτε να εφαρμόζεται χωριστά. Συνιστάται να χρησιμοποιείται ως βοήθημα για το σχεδιασμό μελετών βασιζόμενων στην παρούσα μέθοδο το καθοδηγητικό έγγραφο του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή μελετών δερματικής απορρόφησης (2). Το καθοδηγητικό έγγραφο εκπονήθηκε με σκοπό να διευκολύνει την επιλογή κατάλληλων διαδικασιών *in vitro* για χρήση σε συγκεκριμένες περιστάσεις, ώστε να εξασφαλίζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την παρούσα μέθοδο.

Οι μέθοδοι μέτρησης της απορρόφησης και της ελευθέρωσης από το δέρμα υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες: *in vivo* και *in vitro*. Οι μέθοδοι *in vivo* για τη δερματική απορρόφηση είναι καθιερωμένες και παρέχουν στοιχεία φαρμακοκινητικής για σειρά ειδών ζώων. Μία μέθοδος δοκιμής *in vivo* περιγράφεται χωριστά (1). Για τη μέτρηση της δερματικής απορρόφησης χρησιμοποιούνται επίσης από πολλών ετών μέθοδοι *in vitro*. Αν και δεν έχουν διεξαχθεί επίσημες μελέτες επικύρωσης των μεθόδων *in vitro* που καλύπτει η παρούσα μέθοδος δοκιμών, οι ειδικοί του ΟΟΣΑ συμφώνησαν το 1999 ότι είχε αξιολογηθεί επαρκής όγκος δεδομένων για την υποστήριξη της μεθόδου *in vitro* (3). Λεπτομερέστερα στοιχεία που τεκμηριώνουν την υποστήριξη αυτή, συμπεριλαμβανομένου σημαντικού αριθμού άμεσων συγκρίσεων μεταξύ των μεθόδων *in vitro* και *in vivo*, παρέχονται στο καθοδηγητικό έγγραφο (2). Έχουν δημοσιευθεί ορισμένες μονογραφίες όπου γίνεται επισκόπηση του θέματος αυτού, οι οποίες παρέχουν λεπτομερή βασικά στοιχεία σχετικά με τη χρήση μεθόδων *in vitro* (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). Με τις μεθόδους *in vitro* μετριέται η διάχυση των χημικών ουσιών στο εσωτερικό του δέρματος και μέσω αυτού σε ρευστό υποδοχής, μπορεί δε να χρησιμοποιηθεί μη βιώσιμο δέρμα για τη μέτρηση μόνο της διάχυσης ή μεταβολικώς ενεργό δέρμα, που έχει ληφθεί πρόσφατα, για την ταυτόχρονη μέτρηση της διάχυσης και του δερματικού μεταβολισμού. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα ως τεχνική διαλογής (screen) για τη σύγκριση της ελευθέρωσης χημικών ουσιών από διαφορετικά σκευάσματα εντός και διαμέσου του δέρματος, ενώ παρέχουν επίσης χρήσιμα μοντέλα για την αξιολόγηση της διαδερμικής απορρόφησης στον άνθρωπο.

Η μέθοδος δοκιμής *in vitro* ενδέχεται να μην μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις περιπτώσεις και για όλες τις κατηγορίες χημικών ουσιών. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για μια πρώτη ποιοτική αξιολόγηση της διείσδυσης στο δέρμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να χρειάζεται να συμπληρωθεί με δεδομένα *in vivo*. Για την περαιτέρω μελέτη των καταστάσεων όπου θα ήταν πρόσφορη η μέθοδος *in vitro*, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως βοήθημα το καθοδηγητικό έγγραφο (2). Πρόσθετα λεπτομερή στοιχεία για την υποστήριξη της απόφασης παρέχει η δημοσίευση (3).

Στην παρούσα μέθοδο εκτίθενται οι γενικές αρχές της μέτρησης της δερματικής απορρόφησης και ελευθέρωσης μιας ελεγχόμενης ουσίας με χρήση εκτετμημένου δέρματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί δέρμα από πολλά είδη θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Οι ιδιότητες διαπερατότητας του δέρματος διατηρούνται και μετά την εκτομή από το σώμα, επειδή ο κύριος φραγμός στη διάχυση είναι η μη βιώσιμη κερατίνη στιβάδα και δεν έχει διαπιστωθεί ενεργός μεταφορά χημικών ουσιών μέσω του δέρματος. Έχει καταδειχθεί ότι το δέρμα είναι ικανό να μεταβολίζει ορισμένες χημικές ουσίες κατά τη διαδερμική απορρόφηση (6), αλλά η διεργασία αυτή δεν είναι περιοριστικός παράγοντας για την ταχύτητα απορρόφησης από την άποψη της πραγματικής απορροφώμενης δόσης, αν και ενδέχεται να επηρεάζει το είδος του υλικού που εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Μη απορροφώμενη δόση: αντιπροσωπεύει την ποσότητα που εκπλύνεται από την επιφάνεια του δέρματος μετά την έκθεση και τις ποσότητες που ενδεχομένως ανευρίσκονται στο διαπερατό κάλυμμα, συμπεριλαμβανομένης της δόσης που ενδεχομένως αποδεικνύεται ότι εξατμίζεται από το δέρμα στη διάρκεια της έκθεσης.

Απορροφώμενη δόση (*in vitro*): η μάζα ελεγχόμενης ουσίας που εισχωρεί στο ρευστό υποδοχής ή στη συστηματική κυκλοφορία μέσα σε καθορισμένο χρονικό διάστημα.

Απορροφήσιμη δόση (*in vitro*): αντιπροσωπεύει τη δόση που ανευρίσκεται στην επιφάνεια ή στη μάζα του δέρματος μετά από έκπλυση.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η ελεγχόμενη ουσία, που μπορεί να είναι ραδιοσημασμένη, εφαρμόζεται στην επιφάνεια δείγματος δέρματος, το οποίο χωρίζει τους δύο θαλάμους μιας κυψέλης διάχυσης. Η χημική ουσία αφήνεται πάνω στο δέρμα για καθορισμένο χρονικό διάστημα και σε καθορισμένες συνθήκες και, κατόπιν, απομακρύνεται με κατάλληλη διαδικασία καθαρισμού. Από το ρευστό υποδοχής λαμβάνονται δείγματα σε διάφορους χρόνους σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, τα οποία υποβάλλονται σε ανάλυση για την ελεγχόμενη χημική ουσία ή/και τους μεταβολίτες της.

Όταν χρησιμοποιούνται μεταβολικώς ενεργά συστήματα, μπορεί να εκτελείται ανάλυση των μεταβολιτών της ελεγχόμενης ουσίας με κατάλληλες μεθόδους. Στο τέλος του πειράματος, προσδιορίζονται ποσοτικά, κατά περίπτωση, η κατανομή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των μεταβολιτών της.

Η απορρόφηση της ελεγχόμενης ουσίας στη διάρκεια δεδομένου χρονικού διαστήματος μετριέται σε κατάλληλες συνθήκες, οι οποίες περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο και στο καθοδηγητικό έγγραφο (2), με ανάλυση του ρευστού υποδοχής και του δέρματος που υποβλήθηκε σε αγωγή. Η ελεγχόμενη ουσία που παραμένει στο δέρμα θα πρέπει να θεωρείται ότι απορροφάται, εκτός εάν είναι δυνατόν να καταδειχθεί η δυνατότητα προσδιορισμού της απορρόφησης μόνον από τις τιμές του ρευστού υποδοχής. Η ανάλυση των υπολοίπων συστατικών στοιχείων (υλικό που εκπλύνεται από το δέρμα και παραμένει μέσα στις στιβάδες του) επιτρέπει να αξιολογηθούν περισσότερα δεδομένα, συμπεριλαμβανομένης της συνολικής κατανομής της ελεγχόμενης ουσίας και της επί τοις εκατό ανάκτησής της.

Για να καταδειχθούν οι επιδόσεις και η αξιοπιστία του συστήματος δοκιμής στο εργαστήριο που εκτελεί τη δοκιμή, θα πρέπει να είναι διαθέσιμα τα αποτελέσματα δοκιμών με κατάλληλες χημικές ουσίες αναφοράς και να συμφωνούν με τη βιβλιογραφία που αφορά τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Η απαίτηση αυτή θα μπορούσε να ικανοποιηθεί είτε με την υποβολή κατάλληλης ουσίας αναφοράς σε δοκιμή (κατά προτίμηση λιπόφιλης σε ανάλογο βαθμό με τη ελεγχόμενη ουσία) ταυτόχρονα με την ελεγχόμενη ουσία είτε με την παροχή επαρκών ιστορικών στοιχείων για σειρά ουσιών αναφοράς διαφορετικής λιποφιλίας (π.χ. καφεΐνη, βενζοϊκό οξύ και τεστοστερόνη)

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.4.1 **Κυψέλη διάχυσης**

Η κυψέλη διάχυσης αποτελείται από έναν θάλαμο δότη και έναν θάλαμο υποδοχής, μεταξύ των οποίων τοποθετείται το δέρμα (παράδειγμα τυπικού σχεδίου παρέχεται στο σχήμα 1). Η κυψέλη θα πρέπει να εξασφαλίζει ικανοποιητική στεγανότητα γύρω από το δέρμα και να επιτρέπει την ευχερή δειγματοληψία και την καλή ανάμιξη του διαλύματος υποδοχής που έρχεται σε επαφή με την πίσω πλευρά του δέρματος, καθώς και ικανοποιητικό έλεγχο της θερμοκρασίας της κυψέλης και του περιεχομένου της. Τόσο οι στατικές κυψέλες όσο και οι κυψέλες συνεχούς κυκλοφορίας είναι αποδεκτές. Οι θάλαμοι δότες αφήνονται κατά κανόνα ακάλυπτοι στη διάρκεια της έκθεσης σε πεπερασμένη δόση ελεγχόμενου παρασκευάσματος. Στην περίπτωση όμως των επ' άπειρο εφαρμογών και ορισμένων σεναρίων με πεπερασμένες δόσεις, οι θάλαμοι δότες μπορούν να καλύπτονται.

▼B

1.4.2. **Ρευστό υποδοχής**

Προτιμάται η χρήση φυσιολογικώς αγωγών ρευστών υποδοχής, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα ρευστά υπό τον όρο ότι η επιλογή τους αιτιολογείται. Θα πρέπει να αναφέρεται η ακριβής σύνθεση του ρευστού υποδοχής. Η διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας στο ρευστό υποδοχής θα πρέπει να είναι αποδεδειγμένα επαρκής, ώστε αυτό να μην δρα ως φραγμός στην απορρόφηση. Επί πλέον, το ρευστό υποδοχής δεν θα πρέπει να θίγει τη ακεραιότητα του δερματικού παρασκευάσματος. Στα συστήματα συνεχούς κυκλοφορίας, η ταχύτητα ροής δεν πρέπει να παρεμποδίζει τη διάχυση της ελεγχόμενης ουσίας στο ρευστό υποδοχής. Στα στατικά συστήματα κυψέλης, θα πρέπει να αναδεύεται συνεχώς το ρευστό και να λαμβάνονται από αυτό δείγματα τακτικά. Εάν μελετάται ο μεταβολισμός, το ρευστό υποδοχής πρέπει να συντηρεί τη βιωσιμότητα του δέρματος σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

1.4.3 **Παρασκευάσματα δέρματος**

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί δέρμα ανθρώπου ή ζώων. Είναι γνωστό ότι η χρήση ανθρώπινου δέρματος υπόκειται σε εθνικούς και διεθνείς προβληματισμούς ηθικής φύσεως και δεοντολογικούς όρους. Αν και προτιμάται το βιώσιμο δέρμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μη βιώσιμο, με την προϋπόθεση ότι είναι δυνατόν να καταδειχθεί η ακεραιότητά του. Είναι αποδεκτή είτε η επιδερμική μεμβράνη (αποχωρισμένη με ενζυματική, θερμική ή χημική κατεργασία) ή το δέρμα διατετμημένου πάχους (πάχος 200-400 μm συνήθως), που λαμβάνεται με τη βοήθεια δερματοτόμου. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί δέρμα πλήρους πάχους, αλλά το υπέρμετρο πάχος (πάνω από 1 mm περίπου) θα πρέπει να αποφεύγεται, εκτός εάν απαιτείται ειδικά για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας σε στιβάδες του δέρματος. Η επιλογή του είδους οργανισμού, της ανατομικής θέσης του δέρματος και της τεχνικής της παρασκευής του δείγματος πρέπει να αιτιολογείται. Απαιτούνται αποδεκτά δεδομένα από τέσσερα τουλάχιστον πανομοιότυπα δείγματα για κάθε ελεγχόμενο παρασκεύασμα.

1.4.4 **Ακεραιότητα των παρασκευασμάτων δέρματος**

Η ορθή παρασκευή των δοκιμίων δέρματος είναι καθοριστικής σημασίας. Οι ακατάλληλοι χειρισμοί είναι δυνατόν να προκαλέσουν βλάβες στην κερατίνη στιβάδα και, για τον λόγο αυτό, πρέπει να εξακριβώνεται η ακεραιότητα του δερματικού παρασκευάσματος. Όταν διερευνάται ο μεταβολισμός στο δέρμα, πρέπει να χρησιμοποιείται δέρμα πρόσφατης εκτομής το συντομότερο δυνατόν και σε συνθήκες που είναι γνωστό ότι συντηρούν τη μεταβολική δραστηριότητα. Ως γενική κατεύθυνση, το δέρμα πρόσφατης εκτομής πρέπει να χρησιμοποιείται εντός 24 ωρών, αλλά η αποδεκτή περίοδος αποθήκευσης μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το ενζυματικό σύστημα που υπεισέρχεται στον μεταβολισμό και με τις θερμοκρασίες αποθήκευσης (13). Όταν τα παρασκευάσματα δέρματος έχουν αποθηκευθεί πριν από τη χρήση τους, πρέπει να παρατίθενται στοιχεία από τα οποία προκύπτει ότι διατηρήθηκε η φραγματική λειτουργία.

1.4.5 **Ελεγχόμενη ουσία**

Η ελεγχόμενη ουσία συνίσταται στη χημική οντότητα, τα χαρακτηριστικά διείσδυσης της οποίας πρόκειται να μελετηθούν. Θεωρητικά, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να είναι ραδιοσημασμένη.

1.4.6 **Ελεγχόμενο παρασκεύασμα**

Το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. αναραίωτο, αραιωμένο ή μορφοποιημένο υλικό, το οποίο περιέχει την ελεγχόμενη ουσία και εφαρμόζεται στο δέρμα) θα πρέπει να είναι το ίδιο (ή ρεαλιστικό υποκατάστατο) με εκείνο στο οποίο μπορεί να εκτεθούν άνθρωποι ή άλλα πιθανά είδη στόχου. Κάθε διαφορά από το «εν χρήσει» παρασκεύασμα πρέπει να αιτιολογείται.

▼B

1.4.7 **Συγκεντρώσεις και σκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας**

Κατά κανόνα, χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, οι οποίες καλύπτουν τον ανώτατο βαθμό πιθανής έκθεσης του ανθρώπου. Ομοίως, θα πρέπει να εξετάζεται η δυνατότητα ελέγχου μιας σειράς τυπικών σκευασμάτων.

1.4.8 **Εφαρμογή στο δέρμα**

Στις κανονικές συνθήκες έκθεσης του ανθρώπου σε χημικά προϊόντα, συναντώνται συνήθως πεπερασμένες δόσεις. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να εφαρμόζεται ποσότητα που μιμείται την έκθεση του ανθρώπου, κατά κανόνα 1-5 mg/cm^2 δέρματος στην περίπτωση των στερεών και έως 10 $\mu l/cm^2$ προκειμένου για υγρά. Η εν λόγω ποσότητα θα πρέπει να δικαιολογείται από τις προβλεπόμενες συνθήκες χρήσης, τους στόχους της μελέτης ή από τα φυσικά χαρακτηριστικά του ελεγχόμενου παρασκευάσματος. Για παράδειγμα, οι εφαρμογές στην επιφάνεια του δέρματος μπορεί να είναι άπειρες στις περιπτώσεις όπου εφαρμόζονται μεγάλες ποσότητες ανά μονάδα επιφανείας.

1.4.9 **Θερμοκρασία**

Η παθητική διάχυση χημικών ουσιών (και, συνεπώς, η απορρόφησή τους από το δέρμα) επηρεάζεται από τη θερμοκρασία. Ο θάλαμος διάχυσης και το δέρμα θα πρέπει να διατηρούνται σε σταθερή θερμοκρασία, σε τιμή που πλησιάζει τη φυσιολογική θερμοκρασία του δέρματος των 32 ±1 °C. Τα διάφορα σχέδια κυψέλης απαιτούν διαφορετικές θερμοκρασίες υδατόλουτρου ή θερμαντήρα για να εξασφαλιστεί ότι η θερμοκρασία του υποδοχέα/δέρματος βρίσκεται στα φυσιολογικά επίπεδα. Η υγρασία θα πρέπει κατά προτίμηση να κυμαίνεται μεταξύ 30 και 70 %.

1.4.10 **Διάρκεια έκθεσης και δειγματοληψία**

Το δέρμα μπορεί να εκτίθεται στο ελεγχόμενο παρασκεύασμα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ή για μικρότερα χρονικά διαστήματα (δηλ. για τη μίμηση συγκεκριμένου τύπου έκθεσης του ανθρώπου). Η περίσσεια ελεγχόμενου παρασκευάσματος θα πρέπει να εκπλύνεται από το δέρμα με κατάλληλο προϊόν καθαρισμού και τα υγρά της έκπλυσης να συλλέγονται για ανάλυση. Η διαδικασία απομάκρυνσης του ελεγχόμενου παρασκευάσματος εξαρτάται από τις προβλεπόμενες συνθήκες χρήσης και θα πρέπει να αιτιολογείται. Κατά κανόνα, απαιτείται 24ωρη περίοδος δειγματοληψίας για τον επαρκή χαρακτηρισμό του τύπου απορρόφησης. Δεδομένου ότι η ακεραιότητα του δέρματος ενδέχεται να αρχίσει να υποβαθμίζεται μετά από 24 ώρες, ο χρόνος δειγματοληψίας δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει τις 24 ώρες. Για τις ελεγχόμενες ουσίες που διεισδύουν στο δέρμα με ταχύ ρυθμό, μπορεί να μην χρειάζεται υπέρβαση, αλλά στην περίπτωση των ουσιών που διεισδύουν αργά στο δέρμα, ενδέχεται να απαιτούνται μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Η συχνότητα δειγματοληψίας στο ρευστό υποδοχής θα πρέπει να επιτρέπει τη γραφική παράσταση των χαρακτηριστικών απορρόφησης της ελεγχόμενης ουσίας.

1.4.11 **Διαδικασίες τερματισμού**

Πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση όλα τα συστατικά στοιχεία του συστήματος δοκιμής και να προσδιορίζεται η ανάκτηση. Αυτά περιλαμβάνουν τον θάλαμο δότη, την έκπλυση της επιφάνειας του δέρματος, το παρασκεύασμα δέρματος και το ρευστό/θάλαμο υποδοχής. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να αποχωρίζεται η επιφάνεια δέρματος που εκτέθηκε από εκείνη που βρισκόταν κάτω από τη φλάντζα της κυψέλης και να διαχωρίζεται το δέρμα σε κερατίνη στιβάδα, επιδερμίδα και χόριο για να υποβληθούν σε ανάλυση χωριστά.

1.4.12 **Ανάλυση**

Σε όλες τις μελέτες θα πρέπει να επιτυγχάνεται επαρκής ανάκτηση (θα πρέπει να επιδιώκεται ανάκτηση ραδιενέργειας 100+/-10 % κατά μέσον όρο και να αιτιολογείται η τυχόν απόκλιση). Η ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας στο ρευστό υποδοχής, στο παρασκεύασμα δέρματος και στα υγρά έκπλυσης της επιφάνειας του δέρματος και της συσκευής θα πρέπει να προσδιορίζεται με κατάλληλη τεχνική.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Θα πρέπει να παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης του ρευστού υποδοχής, η κατανομή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σύστημα ελέγχου και τα χαρακτηριστικά της απορρόφησης σε συνάρτηση με τον χρόνο. Όταν χρησιμοποιούνται συνθήκες έκθεσης σε πεπερασμένες δόσεις, θα πρέπει να υπολογίζονται η ποσότητα που εκπλύθηκε από το δέρμα, η ποσότητα που συνδέθηκε με το δέρμα (και με τις διάφορες στιβάδες του, εάν συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση) και η ποσότητα που αναβρέθηκε στο ρευστό υποδοχής (ταχύτητα και ποσότητα ή ποσοστό επί τοις εκατό της δόσης που εφαρμόστηκε). Η δερματική απορρόφηση μπορεί μερικές φορές να εκφράζεται με χρήση μόνο των δεδομένων για το ρευστό υποδοχής. Ωστόσο, εάν η ελεγχόμενη ουσία παραμένει στο δέρμα στο τέλος της μελέτης, μπορεί να πρέπει να συμπεριληφθεί στην συνολική απορροφώμενη ποσότητα (βλ. δημοσίευση (3), παράγραφο 66). Όταν χρησιμοποιούνται συνθήκες έκθεσης σε άπειρη δόση, τα δεδομένα ενδέχεται να επιτρέπουν να υπολογιστεί σταθερά διαπερατότητας (Kp). Στην τελευταία αυτή περίπτωση, το απορροφώμενο ποσοστό επί τοις εκατό δεν έχει σημασία.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να καλύπτει τις απαιτήσεις που ορίζονται στο πρωτόκολλο, μεταξύ των οποίων αιτιολόγηση της χρήσης του συστήματος δοκιμής, και να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική υπόσταση, φυσικοχημικές ιδιότητες (τουλάχιστον μοριακό βάρος και log Pow [συντελεστής κατανομής σε μίγμα οκτανόλης/νερού]), καθαρότητα (ραδιοχημική καθαρότητα),

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. παρτίδας),

— διαλυτότητα στο ρευστό υποδοχής.

Ελεγχόμενο παρασκεύασμα:

— μορφοποίηση και αιτιολόγηση της χρήσης του,

— ομοιογένεια.

Συνθήκες δοκιμής:

— προέλευση και ανατομική θέση του δέρματος, μέθοδος παρασκευής του δοκιμίου, συνθήκες αποθήκευσης πριν από τη χρήση του, τυχόν προκατεργασία (καθαρισμός, αγωγή με αντιβιοτικά κ.λπ.), μετρήσεις της δερματικής ακεραιότητας, μεταβολική κατάσταση, αιτιολόγηση της χρήσης του·

— σχέδιο της κυψέλης, σύνθεση του ρευστού υποδοχής, ταχύτητα ροής του ρευστού υποδοχής ή χρόνοι και διαδικασίες δειγματοληψίας·

— λεπτομέρειες για την εφαρμογή του ελεγχόμενου παρασκευάσματος και τον ποσοτικό προσδιορισμό της δόσης που εφαρμόστηκε·

— διάρκεια έκθεσης·

— λεπτομέρειες για την απομάκρυνση του ελεγχόμενου παρασκευάσματος από το δέρμα, π.χ. έκπλυση του δέρματος·

— λεπτομέρειες για την ανάλυση του δέρματος και για τις τεχνικές διάτμησης που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν για να καταδειχθεί η κατανομή στο δέρμα·

▼B

— διαδικασίες έκπλυσης της κυψέλης και του εξοπλισμού·

— μέθοδοι δοκιμασίας, τεχνικές εκχύλισης, όρια ανίχνευσης και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου.

Αποτελέσματα:

— συνολική ανάκτηση στο πείραμα (εφαρμοζόμενη δόση = υγρά έκπλυσης του δέρματος + δέρμα + ρευστό υποδοχής + υγρά έκπλυσης της κυψέλης)

— παρουσίαση σε πίνακα της επιμέρους ανάκτησης σε κάθε διαμέρισμα της κυψέλης·

— χαρακτηριστικά της απορρόφησης·

— δεδομένα για την απορρόφηση, σε μορφή πίνακα (εκφραζόμενη σε ταχύτητα, ποσότητα ή ποσοστό επί τοις εκατό).

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Μέθοδος δοκιμών B.44. Δερματική απορρόφηση: μέθοδος *in vivo*.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.

6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s. CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et a*l. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

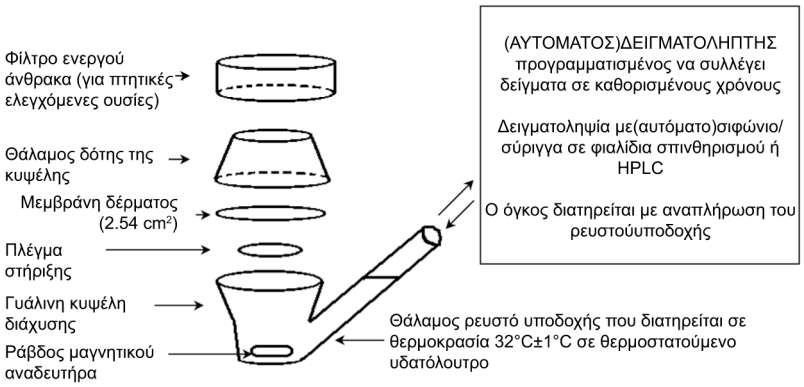
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. Arch Toxicol 74: 356-365.

Σχήμα 1

Παράδειγμα τυπικού σχεδίου στατικής κυψέλης διάχυσης για μελέτες διαδερμικής απορρόφησης *in vitro*



▼M3

Β.46. ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΕΘΙΣΜΟΣ IN VITRO: ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΙΣΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ο όρος «δερματικός ερεθισμός» αναφέρεται στην πρόκληση αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα μετά από εφαρμογή ελεγχόμενης ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών [όπως ορίζεται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Ουσιών (GHS, από τα αρχικά των λέξεων Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals) των Ηνωμένων Εθνών και στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (1) (3)]. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών προβλέπει μια διαδικασία in vitro που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ερεθιστικών χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών και του συστήματος ταξινόμησης, επισήμανσης και συσκευασίας (CLP) της ΕΕ (1) (2) (3). Στην ΕΕ και σε άλλες περιφέρειες που δεν έχουν υιοθετήσει την προαιρετική κατηγορία 3 (ήπια ερεθιστικά) του GHS των Ηνωμένων Εθνών, η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση μη ταξινομούμενων χημικών προϊόντων, δηλαδή εκείνων που κατατάσσονται στην «Καμία κατηγορία» του GHS των Ηνωμένων Εθνών και του CLP της ΕΕ (1) (3). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δερματικής ερεθιστικότητας χημικών προϊόντων ως αυτοτελής δοκιμή υποκατάστασης των δοκιμών δερματικού ερεθισμού in vivo, στο πλαίσιο στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών (4 και κεφάλαιο Β.4 του παρόντος παραρτήματος).

2. Η εκτίμηση του δερματικού ερεθισμού αποτελεί τυπική περίπτωση χρήσης πειραματόζωων [OECD Test Guideline 404, κεφάλαιο Β.4 του παρόντος παραρτήματος](4). Στο πλαίσιο του προβληματισμού για την καλή μεταχείριση των ζώων, η μέθοδος δοκιμών Β.4 αναθεωρήθηκε το 2004 ώστε να επιτρέπει τον προσδιορισμό της διάβρωσης/του ερεθισμού του δέρματος με την εφαρμογή στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών, η οποία συνίσταται στη χρήση επικυρωμένων μεθόδων δοκιμών in vitro ή ex vivo, έτσι ώστε να αποφεύγονται ο πόνος και η ταλαιπωρία των ζώων. Τρεις επικυρωμένες μέθοδοι δοκιμών in vitro έχουν εγκριθεί ως κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών OECD Test Guidelines 430, 431 και 435 (5) (6) (7) και δύο μεταξύ αυτών ως κεφάλαια Β.40 και Β.40α του παρόντος παραρτήματος, για χρήση στο σχετικό με τη διαβρωτικότητα σκέλος της στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών της μεθόδου Β.4 ή OECD Test Guideline 404 (4).

3. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά το τελικό σημείο ανθρώπινης υγείας «δερματικός ερεθισμός». Βασίζεται σε ανασυσταθείσα ανθρώπινη επιδερμίδα (RhE), ο γενικός σχεδιασμός της οποίας (χρήση επιδερμικών κερατινοκυττάρων ανθρώπινης προέλευσης χωρίς μετασχηματισμό ως πηγής κυττάρων, αντιπροσωπευτικού ιστού και κυτταρικής αρχιτεκτονικής) μιμείται σε μεγάλο βαθμό τις βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες των ανώτερων στιβάδων του ανθρώπινου δέρματος, δηλαδή της επιδερμίδας. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει επίσης μια σειρά από πρότυπα επιδόσεων (προσάρτημα 2), τα οποία έχουν αναπτυχθεί από το κέντρο ECVAM της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (8), για την αξιολόγηση παρεμφερών και τροποποιημένων μεθόδων που βασίζονται σε RhE, σύμφωνα με το καθοδηγητικό έγγραφο OECD Guidance Document No. 34 (9).

4. Υπάρχουν τρεις επικυρωμένες μέθοδοι που συμφωνούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών. Έχουν ολοκληρωθεί μελέτες προεπικύρωσης, βελτιστοποίησης και επικύρωσης για μία μέθοδο in vitro (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), με χρήση μοντέλου RhE, η οποία κυκλοφορεί στο εμπόριο με την ονομασία EpiSkin™ (ορίζεται ως «επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς» — VRM). Σύμφωνα με επικύρωση βασισμένη σε πρότυπα επιδόσεων (21), δύο άλλες μέθοδοι δοκιμών δερματικού ερεθισμού in vitro σε RhE που κυκλοφορούν στο εμπόριο αποδείχθηκε ότι έχουν αποτελέσματα παραπλήσια με εκείνα της VRM —πρόκειται για τις μεθόδους EpiDerm™ SIT (EPI-200) και SkinEthic™ (22).

▼M3

5. Πριν από τη χρήση προτεινόμενης παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου δοκιμών in vitro σε RhE για κανονιστικούς σκοπούς, εκτός από τις μεθόδους VRM, EpiDerm™ SIT (EPI-200) και SkinEthic™, πρέπει να προσδιορίζονται η αξιοπιστία της, η καταλληλότητά της (ορθότητα) και οι περιορισμοί της προτεινόμενης χρήσης της, σύμφωνα με τις απαιτήσεις των προτύπων για τις επιδόσεις που παρατίθενται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (προσάρτημα 2), ώστε να εξασφαλίζεται ότι οι παράμετροι αυτές είναι ανάλογες με εκείνες της VRM. Επιπλέον, πριν από την ανάπτυξη και επικύρωση παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου δοκιμών in vitro σε RhE και την υποβολή της για έγκριση προς κανονιστική χρήση, συνιστάται να ανατρέχουν οι ενδιαφερόμενοι στο επεξηγηματικό έγγραφο του ΟΟΣΑ σχετικά με τη διεξαγωγή δοκιμών δερματικού ερεθισμού in vitro (23).

ΟΡΙΣΜΟΙ

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

7. Όπως κατέδειξε η μελέτη επικύρωσης (16), ένας περιοριστικός παράγοντας για τη μέθοδο δοκιμών είναι το ότι δεν επιτρέπει την κατάταξη χημικών προϊόντων στην προαιρετική κατηγορία 3 (ήπια ερεθιστικά) του GHS των Ηνωμένων Εθνών (1). Όταν η μέθοδος χρησιμοποιείται ως δοκιμή μερικής υποκατάστασης, ενδέχεται να απαιτούνται δοκιμές μεταπαρακολούθησης in vivo για τον πλήρη χαρακτηρισμό του δυναμικού δερματικού ερεθισμού (4 και κεφάλαιο Β.4 του παρόντος παραρτήματος). Είναι γνωστό ότι η χρήση ανθρώπινου δέρματος υπόκειται σε εθνικούς και διεθνείς προβληματισμούς ηθικής φύσεως και δεοντολογικούς όρους.

8. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών αφορά τον σχετικό με τον in vitro δερματικό ερεθισμό σκέλος της στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών της μεθόδου Β.4 (OECD Test Guideline 404) για τη δερματική διάβρωση/ερεθισμό (4). Ενώ δεν παρέχει επαρκή στοιχεία για τη διάβρωση του δέρματος, επισημαίνεται ότι η μέθοδος Β.40α (OECD Test Guideline 431) για τη διάβρωση του δέρματος βασίζεται στο ίδιο σύστημα δοκιμών σε RhE, αλλά χρησιμοποιεί άλλο πρωτόκολλο (κεφάλαιο Β.40α). Η παρούσα μέθοδος βασίζεται σε μοντέλα RhE όπου χρησιμοποιούνται ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, τα οποία, συνεπώς, αποτελούν in vitro το στοχευόμενο όργανο του είδους που ενδιαφέρει. Επιπλέον, καλύπτει το αρχικό στάδιο της αλληλουχίας αντιδράσεων (cascade)/του μηχανισμού δράσης της φλεγμονής (βλάβη των κυττάρων και των ιστών που έχει ως αποτέλεσμα εντοπισμένο τραύμα) που επιτελείται κατά τον ερεθισμό in vivo. Κατά την επικύρωση στην οποία στηρίζεται η παρούσα μέθοδος δοκιμών ελέγχθηκε ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, η δε εμπειρική βάση δεδομένων της μελέτης επικύρωσης καλύπτει συνολικά 58 χημικές ουσίες (16) (18) (23). Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε στερεά, υγρά, ημιστερεά και κηρούς. Τα υγρά μπορούν να είναι υδατικά ή μη και τα στερεά να είναι υδατοδιαλυτά ή μη. Τα στερεά πρέπει, κατά το δυνατόν, να μετατρέπονται σε λεπτόκοκκη σκόνη πριν από την εφαρμογή· δεν απαιτείται άλλη προκατεργασία του δείγματος. Τα αέρια και τα αερολύματα (αεροζόλ) δεν έχουν ακόμη αποτελέσει το αντικείμενο μελέτης επικύρωσης (24). Παρά τη θεωρητική δυνατότητα δοκιμής αερίων και αεροζόλ με την τεχνολογία RhE, δεν είναι δυνατός ο έλεγχός τους με την παρούσα μέθοδο δοκιμών. Σημειωτέον επίσης ότι οι χημικές ουσίες έντονου χρώματος ενδέχεται να παρεμποδίσουν τις μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας και καθιστούν αναγκαία τη χρήση προσαρμοσμένων μαρτύρων για διορθώσεις (βλέπε παραγράφους 24-26).

9. Για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες των οποίων η ταξινόμηση είναι αναμφίβολη, αναμένεται να αρκεί μία μόνο σειρά μετρήσεων με τριπλό δείγμα ιστού. Όταν όμως το αποτέλεσμα είναι οριακό, όπως η ασυμφωνία μεταξύ των μετρήσεων των πολλαπλών δειγμάτων και/ή μια μέση τιμή βιωσιμότητας ίση με 50 ± 5 %, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εκτέλεσης δεύτερης σειράς μετρήσεων, ακόμη και τρίτης σειράς, σε περίπτωση ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων σειρών.

▼M3

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

10. Η ελεγχόμενη χημική ουσία εφαρμόζεται τοπικά σε τρισδιάστατο μοντέλο RhE, το οποίο αποτελείται από φυσιολογικά επιδερμικά κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης που δεν έχουν μετασχηματιστεί και έχουν καλλιεργηθεί ώστε να σχηματίσουν μοντέλο της ανθρώπινης επιδερμίδας με επαλληλία στιβάδων υψηλής διαφοροποίησης. Το μοντέλο αυτό συνίσταται από τις εξής οργανωμένες στιβάδες: βασική, ακανθώδη και κοκκώδη, καθώς και από πολυστρωματική κεράτινη στιβάδα που περιέχει μεσοκυττάρια φολιδωτά στρώματα λιπιδίων που αντιπροσωπεύουν τις κυριότερες κατηγορίες λιπιδίων, τα οποία είναι ανάλογα με εκείνα που συναντώνται in vivo.

11. Ο επαγόμενος από χημική ουσία ερεθισμός του δέρματος, ο οποίος εκδηλώνεται με ερύθημα και οίδημα, είναι αποτέλεσμα μιας ακολουθίας συμβάντων που αρχίζει με διείσδυση στην κεράτινη στιβάδα και πρόκληση βλάβης στις υποκείμενες στιβάδες κερατινοκυττάρων. Τα θνήσκοντα κερατινοκύτταρα ελευθερώνουν μεσολαβητές που αρχίζουν την αλληλουχία αντιδράσεων της φλεγμονής στο χόριο, ιδίως στα στρωματικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το παρατηρούμενο ερύθημα και οίδημα οφείλεται ακριβώς στη διάταση και την αυξημένη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κύτταρων (24). Οι μέθοδοι που βασίζονται σε RhE μετρούν τα εναρκτήρια συμβάντα της αλληλουχίας.

12. Η κυτταρική βιωσιμότητα στα μοντέλα RhE μετράται με ενζυμική μετατροπή της χρωστικής ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, μπλε του θειαζολυλίου, αριθ. CAS: 298-93-1] σε μπλε άλας φορμαζάνης, το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μετά την εκχύλισή του από τους ιστούς (25). Οι ερεθιστικές χημικές ουσίες αναγνωρίζονται από την ικανότητά τους να μειώνουν την κυτταρική βιωσιμότητα σε επίπεδα χαμηλότερα από καθορισμένα κατώφλια (δηλαδή ≤ 50 %, στην περίπτωση της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ). Ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο εντός του οποίου χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της παρούσας μεθόδου δοκιμών, οι χημικές ουσίες που οδηγούν σε κυτταρική βιωσιμότητα υψηλότερη από τα επίπεδα κατωφλίου μπορούν να θεωρούνται μη ερεθιστικές (δηλαδή τιμή > 50 % συνεπάγεται «Καμία κατηγορία»).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

13. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική κάποια από τις τρεις επικυρωμένες μεθόδους που συμφωνούν με την παρούσα μέθοδο δοκιμών, τα εργαστήρια πρέπει να αποδείξουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις δέκα χημικές ουσίες αναφοράς που παρατίθενται στον πίνακα 1. Σε περίπτωση ανάπτυξης παρεμφερών μεθόδων βάσει της παρούσας μεθόδου δοκιμών ή τροποποίησης κάποιας από τις τρεις επικυρωμένες μεθόδους, πρέπει να πληρούνται οι σχετικές με τα πρότυπα επιδόσεων απαιτήσεις του προσαρτήματος 2 της παρούσας μεθόδου δοκιμών, για να χρησιμοποιηθεί η νέα μέθοδος για δοκιμές βάσει κανονιστικών ρυθμίσεων.

14. Στο πλαίσιο της διαδικασίας απόδειξης ικανότητας, συνιστάται να ελέγχουν οι χρήστες τις ιδιότητες φραγμού των ιστών, κατά τις προδιαγραφές του παραγωγού του μοντέλου RhE, μετά την παραλαβή τους. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις μεταφοράς των ιστών σε μεγάλες αποστάσεις/με μεγάλη διάρκεια. Μετά την επιτυχή εδραίωση της μεθόδου και αφού αποδειχθεί η ικανότητα χρήσης της, ο εν λόγω έλεγχος δεν είναι απαραίτητος ως συνήθης πρακτική. Παρ' όλα αυτά, όταν η μέθοδος εισάγεται στη συνήθη πρακτική, συνιστάται να συνεχίζεται η αξιολόγηση των ιδιοτήτων φραγμού σε τακτά διαστήματα.

Πίνακας 1

Χημικές ουσίες αναφοράς [1]

Χημική ουσία	Αριθ. CAS	Βαθμολογία in vivo [2]	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ
ναφθαλινοξικό οξύ	86-87-3	0	Στερεό	Καμία
ισοπροπανόλη	67-63-0	0,3	Υγρό	Καμία

▼M3

Χημική ουσία	Αριθ. CAS	Βαθμολογία in vivo ([2])	Φυσική κατάσταση	Κατηγορία του GHS των Ηνωμένων Εθνών/ CLP της ΕΕ
στεατικό μεθύλιο	112-61-8	1	Στερεό	Καμία
βουτυρικό επτύλιο	5870-93-9	1,7	Υγρό	Καμία *(Προαιρετική κατηγορία 3)* ([3]) ([4])
σαλικυλικό εξύλιο	6259-76-3	2	Υγρό	Καμία *(Προαιρετική κατηγορία 3)* ([3]) ([4])
κυκλαμιναλδεΰδη	103-95-7	2,3	Υγρό	Κατηγορία 2
1-βρωμοεξάνιο	111-25-1	2,7	Υγρό	Κατηγορία 2
υδροξείδιο του καλίου (υδατικό διάλυμα 5 %)	1310-58-3	3	Υγρό	Κατηγορία 2
1-μεθυλο-3-φαινυλο-1-πιπεραζίνη	5271-27-2	3,3	Στερεό	Κατηγορία 2
επτανάλη	111-71-7	3,4	Υγρό	Κατηγορία 2

([1]) Αυτές οι χημικές ουσίες αναφοράς είναι υποσύνολο των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης.
([2]) Βαθμολογία in vivo σύμφωνα με τη μέθοδο B.4 και την κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 404 (4).
([3]) Στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, η προαιρετική κατηγορία 3 (ήπια ερεθιστικά) του GHS των Ηνωμένων Εθνών (1) θεωρείται «Καμία κατηγορία».
([4]) Η προαιρετική κατηγορία 3 του GHS των Ηνωμένων Εθνών δεν εφαρμόζεται στο πλαίσιο του CLP της ΕΕ.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

15. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα στοιχεία και οι διαδικασίες μιας μεθόδου δοκιμών σε RhE για την εκτίμηση του δερματικού ερεθισμού. Χρειάζεται ανασύσταση του μοντέλου RhE, το οποίο μπορεί να κατασκευαστεί στο εργαστήριο ή να ληφθεί από το εμπόριο. Έχουν συνταχθεί τυποποιημένες διαδικασίες (SOP, από τα αρχικά των λέξεων Standard Operating Procedures) για τα μοντέλα EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) και SkinEthic™ (26) (27) (28). Οι δοκιμές θα πρέπει να διεξάγονται ως εξής:

Συστατικα Στοιχεια Τησ Μεθοδου Δοκιμων RhE

Γενικοί όροι

16. Πρέπει να χρησιμοποιούνται ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, χωρίς μετασχηματισμό, για την ανασύσταση του επιθηλίου. Πρέπει να υπάρχουν πολλαπλές στιβάδες βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων (βασική, ακανθώδης, κοκκώδης) κάτω από μία λειτουργική κεράτινη στιβάδα. Η κεράτινη στιβάδα πρέπει να είναι πολυστρωματική και να διαθέτει τα αναγκαία λιπιδικά χαρακτηριστικά, ώστε να δημιουργεί στέρεο λειτουργικό φραγμό, ανθεκτικό στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών-δεικτών, π.χ. δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) ή Triton X-100. Η λειτουργία φραγμού πρέπει να καταδεικνύεται και είναι δυνατόν να εκτιμηθεί με προσδιορισμό είτε της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία-δείκτης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % (IC_{50}), μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, είτε του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % (ET_{50}) μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της χημικής ουσίας-δείκτη. Οι ιδιότητες συγκράτησης του μοντέλου RhE πρέπει να αποτρέπουν την παράκαμψη της κεράτινης στιβάδας από το υλικό και την είσοδό του στον βιώσιμο ιστό, η οποία θα συνεπαγόταν ατελή μοντελοποίηση της έκθεσης του δέρματος. Το μοντέλο RhE πρέπει να μην έχει μολυνθεί με βακτηρίδια, ιούς, μυκόπλασμα ή μύκητες.

▼M3

Λειτουργικοί όροι

Βιωσιμότητα

17. Για τον προσδιορισμό της τάξης μεγέθους της βιωσιμότητας χρησιμοποιείται η δοκιμασία MTT (25). Οι χρήστες του μοντέλου RhE πρέπει να εξασφαλίζουν ότι κάθε παρτίδα του εν λόγω μοντέλου πληροί καθορισμένα κριτήρια για τον αρνητικό μάρτυρα. Η οπτική πυκνότητα (OD) του διαλύτη εκχύλισης πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, δηλαδή μικρότερη από 0,1. Ο δημιουργός/προμηθευτής του μοντέλου RhE καθορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για την OD του αρνητικού μάρτυρα (στις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών δερματικού ερεθισμού). Τα πεδία τιμών αποδοχής για τις τρεις επικυρωμένες μεθόδους εμφαίνονται στον πίνακα 2. Πρέπει να τεκμηριώνεται ότι οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα είναι σταθεροί σε καλλιέργεια (οι μετρήσεις βιωσιμότητας παρέχουν παραπλήσιες τιμές) για τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης που προβλέπεται στη δοκιμή.

Πίνακας 2

Πεδία τιμών αποδοχής για την OD του αρνητικού μάρτυρα

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RhE	≥ 1,2	≤ 2,5

Λειτουργία φραγμού

18. Η κεράτινη στιβάδα και η λιπιδική της σύσταση πρέπει να ανθίστανται επαρκώς στην ταχεία διείσδυση κυτταροτοξικών χημικών ουσιών-δεικτών, π.χ. SDS ή Triton X-100, όπως εκτιμάται με τη βοήθεια της τιμής IC_{50} ή ET_{50} (πίνακας 3).

Μορφολογία

19. Το μοντέλο RhE πρέπει να υποβάλλεται σε ιστολογική εξέταση, από την οποία να προκύπτει δομή όμοια με εκείνη της ανθρώπινης επιδερμίδας (συμπεριλαμβανομένης της ύπαρξης πολυστρωματικής κεράτινης στιβάδας).

Αναπαραγωγιμότητα

20. Τα αποτελέσματα για τη χημική ουσία που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας και για τους αρνητικούς μάρτυρες στη μέθοδο δοκιμών πρέπει να καταδεικνύουν διαχρονική αναπαραγωγιμότητα.

Ποιοτικός έλεγχος

21. Ο δημιουργός/προμηθευτής του μοντέλου RhE πρέπει να εξασφαλίζει και να αποδεικνύει ότι κάθε παρτίδα του εν λόγω μοντέλου ανταποκρίνεται σε καθορισμένα κριτήρια αποδέσμευσης παρτίδων παραγωγής, τα σημαντικότερα από τα οποία είναι εκείνα που αφορούν τη *βιωσιμότητα* (παράγραφος 17), τη *λειτουργία φραγμού* (παράγραφος 18) και τη *μορφολογία* (παράγραφος 19). Τα σχετικά δεδομένα πρέπει να γνωστοποιούνται στους χρήστες της μεθόδου ώστε αυτοί να είναι σε θέση να τα συμπεριλάβουν στην έκθεση δοκιμής. Ο δημιουργός/προμηθευτής του μοντέλου RhE (ή, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται μοντέλο εσωτερικής κατασκευής, ο ερευνητής) πρέπει να καθορίζει πεδίο τιμών αποδοχής (ανώτερο και κατώτερο όριο) για την IC_{50} ή τον ET_{50}. Δεκτά για την αξιόπιστη πρόγνωση της ταξινόμησης ως προς τον ερεθισμό μπορούν να γίνουν μόνο αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με ιστούς οι οποίοι πληρούν τα κριτήρια. Στον πίνακα 3 παρατίθενται, ενδεικτικά, τα πεδία τιμών αποδοχής για τις τρεις επικυρωμένες μεθόδους αναφοράς.

▼M3

Πίνακας 3

Παραδείγματα κριτηρίων ποιοτικού ελέγχου για την αποδέσμευση παρτίδων παραγωγής

	Κατώτερο όριο αποδοχής	Ανώτερο όριο αποδοχής
EpiSkin™ (SM) (αγωγή 18 ωρών με SDS) (26)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET_{50} = 4,8 ώρες	ET_{50} = 8,7 ώρες
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET_{50} = 4,0 ώρες	ET_{50} = 9,0 ώρες

Εφαρμογή των ελεγχόμενων χημικών ουσιών και των χημικών ουσιών-μαρτύρων

22. Σε κάθε μέτρηση πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία πανομοιότυπα δείγματα για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία και για τους μάρτυρες. Προκειμένου τόσο για υγρά όσο και για στερεά, πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ώστε να καλύπτεται ομοιόμορφα η επιφάνεια της επιδερμίδας και, ταυτόχρονα, να αποφεύγονται οι άπειρες δόσεις, δηλαδή πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 25 $\mu L/cm^2$ ή 25 mg/cm^2. Στην περίπτωση των στερεών, η επιφάνεια της επιδερμίδας πρέπει να υγραίνεται με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό πριν από την εφαρμογή, ώστε να βελτιώνεται η επαφή της με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Τα στερεά θα πρέπει, κατά το δυνατόν, να ελέγχονται σε μορφή λεπτόκοκκης σκόνης. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, η ελεγχόμενη χημική ουσία πρέπει να εκπλύνεται επιμελώς από την επιφάνεια της επιδερμίδας με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα ή με διάλυμα NaCl 0,9 %. Ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο RhE μεταξύ των τριών επικυρωμένων, η περίοδος έκθεσης κυμαίνεται από 15 έως 60 λεπτά και η θερμοκρασία επώασης από 20 έως 37 °C. Αυτές οι περίοδοι και θερμοκρασίες έκθεσης βελτιστοποιούνται για καθεμία από τις μεθόδους RhE και αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά εγγενή χαρακτηριστικά τους —για περισσότερες λεπτομέρειες, βλέπε τις τυποποιημένες διαδικασίες (SOP) των μεθόδων (26) (27) (28).

23. Σε κάθε μέτρηση πρέπει να χρησιμοποιούνται παράλληλοι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες για να αποδεικνύεται ότι η βιωσιμότητα (με τον αρνητικό μάρτυρα), η λειτουργία φραγμού και η συνακόλουθη ευαισθησία των ιστών (με τον θετικό μάρτυρα) περικλείονται εντός καθορισμένου ιστορικού πεδίου τιμών αποδοχής. Ο συνιστώμενος θετικός μάρτυρας είναι υδατικό διάλυμα SDS 5 %. Η συνιστώμενη ως αρνητικός μάρτυρας ουσία είναι το νερό ή φυσιολογικός ορός στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS).

Μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας

24. Το σημαντικότερο στοιχείο της διαδικασίας δοκιμών είναι η μέτρηση της βιωσιμότητας όχι αμέσως μετά την έκθεση στις ελεγχόμενες χημικές ουσίες, αλλά αφού προηγηθεί επώαση των εκπλυθέντων ιστών σε πρόσφατο θρεπτικό υλικό για αρκούντως μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την αγωγή. Το χρονικό αυτό διάστημα επιτρέπει τόσο την αποκατάσταση ύστερα από ασθενείς κυτταροτοξικές επιδράσεις, όσο και την εκδήλωση σαφών κυτταροτοξικών επιδράσεων. Το στάδιο βελτιστοποίησης της δοκιμής (11) (12) (13) (14) (15) κατέδειξε ότι ο βέλτιστος χρόνος επώασης μετά την αγωγή είναι 42 ώρες.

25. Η δοκιμασία MTT αποτελεί επικυρωμένη ποσοτική μέθοδο η οποία πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών και είναι συμβατή με τη χρήση σε τρισδιάστατο ιστικό μόρφωμα. Το δείγμα ιστού φέρεται σε διάλυμα MTT κατάλληλης συγκέντρωσης (π.χ. 0,3-1 mg/mL), όπου αφήνεται να παραμείνει επί τρίωρο. Στη συνέχεια, το σχηματιζόμενο μπλε ίζημα φορμαζάνης εκχυλίζεται από τον ιστό με διαλύτη (π.χ. ισοπροπανόλη, όξινο διάλυμα ισοπροπανόλης) και μετράται η συγκέντρωση της φορμαζάνης με προσδιορισμό της OD σε μήκος κύματος 570 nm, με φίλτρο μέγιστης ζώνης διάβασης ± 30 nm.

▼M3

26. Οι οπτικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή η χημική της δράση επί της MTT ενδέχεται να παρεμποδίσουν τη δοκιμασία, με αποτέλεσμα εσφαλμένη εκτίμηση της βιωσιμότητας (επειδή η ελεγχόμενη ουσία, εκτός του ότι μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό του χρώματος, μπορεί και να τον παρεμποδίσει ή να τον αναστρέψει). Αυτό ενδέχεται να συμβεί όταν μια συγκεκριμένη ελεγχόμενη χημική ουσία δεν απομακρυνθεί τελείως από τον ιστό με την έκπλυση ή διαπεράσει την επιδερμίδα. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία δρα απευθείας επί της MTT (αναγωγικό της MTT), είναι εκ φύσεως έγχρωμη ή χρωματίζεται κατά την αγωγή του ιστού, πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετοι μάρτυρες για την ανίχνευση και διόρθωση της παρεμπόδισης της τεχνικής μετρήσεων της βιωσιμότητας από την ελεγχόμενη ουσία. Ο τρόπος διόρθωσης της άμεσης αναγωγής της MTT και της παρεμποδιστικής δράσης των έγχρωμων ουσιών περιγράφεται λεπτομερώς στις SOP των τριών επικυρωμένων μεθόδων (26) (27) (28).

Κριτήρια αποδοχής

27. Για κάθε μέθοδο στην οποία χρησιμοποιούνται έγκυρες παρτίδες μοντέλου RhE (βλέπε παράγραφο 21), η OD των ιστών που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αρνητικό μάρτυρα πρέπει να αντιστοιχεί στην ποιότητα των ιστών στους οποίους εφαρμόστηκαν όλα τα στάδια της αποστολής και παραλαβής και όλες οι διεργασίες του πρωτοκόλλου. Οι τιμές OD των μαρτύρων δεν πρέπει να είναι χαμηλότερες από τα ιστορικά καθορισμένα όρια. Ομοίως, οι ιστοί που υποβάλλονται σε αγωγή με τον θετικό μάρτυρα, δηλαδή με υδατικό διάλυμα SDS 5 %, πρέπει να εκδηλώνουν την οικεία ικανότητα απόκρισης σε ερεθιστική χημική ουσία στις συνθήκες της μεθόδου δοκιμών (26) (27) (28). Πρέπει να καθορίζονται τα κατάλληλα σχετικά μέτρα μεταβλητότητας μεταξύ των πολλαπλών δειγμάτων ιστών (π.χ. εάν χρησιμοποιείται η τυπική απόκλιση (SD), η τιμή της θα πρέπει να περικλείεται εντός του μονόπλευρου διαστήματος ανοχής 95 % που έχει υπολογιστεί από ιστορικά δεδομένα· για τη VRM, SD < 18 %).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και προγνωστικό μοντέλο

28. Οι τιμές OD που προκύπτουν για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του επί τοις εκατό ποσοστού βιωσιμότητας με κανονικοποίηση ως προς τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος ορίζεται σε 100 %. Η τιμή διαχωρισμού (cut-off value) ποσοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας, η οποία διακρίνει τις ερεθιστικές από τις μη ταξινομούμενες ελεγχόμενες χημικές ουσίες, καθώς και η (οι) στατιστική(-ές) διαδικασία(-ες) που χρησιμοποιείται(-ούνται) για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και την αναγνώριση των ερεθιστικών χημικών ουσιών, πρέπει να καθορίζονται επακριβώς, να τεκμηριώνονται και να είναι αποδεδειγμένα κατάλληλες. Οι τιμές διαχωρισμού για την πρόγνωση του ερεθισμού είναι οι εξής:

— η ελεγχόμενη χημική ουσία θεωρείται ερεθιστική για το δέρμα και ανήκει στην κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ εάν η βιωσιμότητα των ιστών ύστερα από έκθεση και επώαση μετά την αγωγή είναι μικρότερη ή ίση με (≤) 50 %,

— ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο εντός του οποίου χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της παρούσας μεθόδου δοκιμών, η ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να θεωρείται μη ερεθιστική για το δέρμα, υπαγόμενη στην «καμία κατηγορία» του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ εάν η βιωσιμότητα των ιστών ύστερα από έκθεση και επώαση μετά την αγωγή είναι μεγαλύτερη από (>) 50 %.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Δεδομένα

29. Για κάθε μέτρηση, πρέπει να αναφέρονται, σε μορφή πίνακα, τα δεδομένα που προέκυψαν για κάθε επιμέρους δείγμα ιστών (π.χ. τιμές OD και υπολογισθέν επί τοις εκατό ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία, καθώς και ταξινόμηση), συμπεριλαμβανομένων δεδομένων από επαναληπτικά πειράματα, κατά περίπτωση. Επιπλέον, πρέπει να αναφέρονται, για κάθε μέτρηση, οι μέσες τιμές ± SD. Για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία πρέπει να αναφέρονται οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις με το αντιδραστήριο MTT και τις έγχρωμες ελεγχόμενες χημικές ουσίες.

▼**M3**

Έκθεση δοκιμής

30. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία και μάρτυρες:

— χημική(-ές) ονομασία(-ες), όπως ονομασία και αριθμός CAS, ονομασία και αριθμός EC, εφόσον είναι γνωστά,

— καθαρότητα και σύσταση της χημικής ουσίας (σε κατά βάρος εκατοστιαία αναλογία),

— φυσικές/χημικές ιδιότητες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης (π.χ. φυσική κατάσταση, σταθερότητα, πτητικότητα, pH και υδατοδιαλυτότητα, εάν είναι γνωστή),

— κατεργασία της ελεγχόμενης ουσίας/των μαρτύρων πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση),

— συνθήκες αποθήκευσης.

Αιτιολόγηση του μοντέλου RhE και του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκαν.

Συνθήκες δοκιμής:

— χρησιμοποιηθέν κυτταρικό σύστημα,

— πλήρη στοιχεία τεκμηρίωσης για το συγκεκριμένο μοντέλο RhE που χρησιμοποιήθηκε, συμπεριλαμβανομένων των επιδόσεών του. Τα εν λόγω στοιχεία πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά:

  i) βιωσιμότητα

  ii) λειτουργία φραγμού

  iii) μορφολογία

  iv) αναπαραγωγιμότητα και προγνωστικότητα

  v) ποιοτικούς έλεγχους του μοντέλου,

— λεπτομέρειες για την εφαρμοσθείσα διαδικασία δοκιμών,

— χρησιμοποιηθείσες δόσεις δοκιμής, διάρκεια της έκθεσης και της μετά την αγωγή επώασης,

— περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής,

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για το μοντέλο. Τα εν λόγω δεδομένα πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα, χωρίς να περιορίζονται σ' αυτά:

  i) αποδοχή των δεδομένων ποιοτικού ελέγχου σε σχέση με ιστορικά δεδομένα για τις παρτίδες

  ii) αποδοχή των τιμών του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα σε σχέση με τις μέσες τιμές και το εύρος τιμών που αφορούν τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα,

— περιγραφή των χρησιμοποιηθέντων κριτηρίων αξιολόγησης, όπου συμπεριλαμβάνεται αιτιολόγηση της επιλογής της ή των τιμών διαχωρισμού για το προγνωστικό μοντέλο,

— παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα για τους μάρτυρες.

▼**M3**

Αποτελέσματα:

— πίνακας με τα δεδομένα από τις επιμέρους ελεγχόμενες χημικές ουσίες για κάθε μέτρηση και κάθε επανάληψη μέτρησης,

— αναφορά των χρησιμοποιηθέντων μαρτύρων για ελεγχόμενες χημικές ουσίες που είναι αναγωγικά της MTT και/ή έγχρωμες,

— περιγραφή άλλων παρατηρούμενων επιδράσεων.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) EC-ECVAM (2009), Statement on the «Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards», issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(3) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 (ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1).

(4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765–770.

▼M3

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests — An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task force report 2, ATLA 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.

(17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.

(20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

(24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231-243.

▼**M3**

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Οδηγία 2001/59/ΕΚ της Επιτροπής, της 6ης Αυγούστου 2001, σχετικά με την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο, για εικοστή όγδοη φορά, της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν στην ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών (ΕΕ L 225 της 21.8.2001, σ. 1).

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1-4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, ALTEX, 14, 359-365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109-116.

▼M3

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (9).

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος με την οποία μετράται η συνολική δραστηριότητα κυτταρικού πληθυσμού, π.χ. ως ικανότητα των κυτταρικών μιτοχονδριακών αφυδρογονασών να ανάγουν τη χρωστική ζωτικής χρώσης MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, μπλε του θειαζολυλίου], η οποία, ανάλογα με το μετρούμενο τελικό σημείο και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό δοκιμής, συσχετίζεται με τον συνολικό αριθμό και/ή τη ζωτικότητα των κυττάρων.

Συμφωνία: μέτρο των επιδόσεων των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «ορθότητα» και ορίζεται ως το ποσοστό του συνόλου των ελεγχόμενων χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά ως θετικές ή αρνητικές (9).

ET_{50}: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση με τον προσδιορισμό του χρόνου έκθεσης που απαιτείται για να μειωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50 % μετά την εφαρμογή καθορισμένης συγκέντρωσης της ουσίας-δείκτη, βλέπε επίσης IC_{50}.

CLP της ΕΕ [κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων]: κανονισμός με τον οποίο εφαρμόζεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) το σύστημα ταξινόμησης και επισήμανσης των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) (3).

GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals — Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα των Ηνωμένων Εθνών για την ταξινόμηση και επισήμανση των χημικών προϊόντων): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων, με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (1).

IC_{50}: η τιμή αυτή μπορεί να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία μια χημική ουσία-δείκτης μειώνει τη βιωσιμότητα των ιστών κατά 50 % μετά από καθορισμένο χρόνο έκθεσης, βλέπε επίσης ET_{50}.

Άπειρη δόση: ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στην επιδερμίδα και υπερβαίνει την απαιτούμενη για την πλήρη και ομοιόμορφη κάλυψη της επιδερμικής επιφάνειας.

Δοκιμή me-too: έκφραση της καθομιλουμένης που παραπέμπει σε μέθοδο δοκιμών η οποία είναι δομικά και λειτουργικά ανάλογη με επικυρωμένη και εγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών αναφοράς. Η εν λόγω μέθοδος δοκιμών προσφέρεται για ταχεία επικύρωση (catch-up validation). Ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «παρεμφερή μέθοδο δοκιμών» (9).

Πρότυπα επιδόσεων: πρότυπα που βασίζονται σε επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και παρέχουν τη βάση για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας προτεινόμενης μεθόδου δοκιμών η οποία είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής. Τα πρότυπα επιδόσεων περιλαμβάνουν i) βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών, ii) κατάλογο ελάχιστων ουσιών αναφοράς, οι οποίες έχουν επιλεγεί μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδειξη των αποδεκτών επιδόσεων της επικυρωμένης μεθόδου αναφοράς και iii) τα συγκρίσιμα επίπεδα ορθότητας και αξιοπιστίας, που βασίζονται στα επιτευχθέντα για την επικυρωμένη μέθοδο δοκιμών και τα οποία πρέπει να επιδεικνύει η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμών όταν αξιολογείται με χρήση του καταλόγου ελαχίστων ουσιών αναφοράς (9).

▼**M3**

Χημικές ουσίες αναφοράς: χημικές ουσίες που επιλέγονται για να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία επικύρωσης και για τις οποίες είναι ήδη γνωστές οι αποκρίσεις στο σύστημα δοκιμών αναφοράς in vitro ή in vivo ή στο ζωικό είδος που ενδιαφέρει. Οι εν λόγω χημικές ουσίες πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές, αφενός των τάξεων χημικών προϊόντων στις οποίες προβλέπεται ότι θα εφαρμόζεται η μέθοδος δοκιμών και, αφετέρου, του πλήρους φάσματος των αποκρίσεων —ισχυρή, ασθενής, αρνητική— που αναμένονται για τις χημικές ουσίες στις οποίες μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος. Ενδέχεται να απαιτούνται διαφορετικές σειρές χημικών ουσιών αναφοράς για τα διάφορα στάδια της διαδικασίας επικύρωσης, καθώς και για τις διάφορες μεθόδους δοκιμών και χρήσεις των δοκιμών (9).

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την επίδραση που ενδιαφέρει και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση που ενδιαφέρει. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της μεθόδου δοκιμών (9).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (9).

Δοκιμή υποκατάστασης: δοκιμή που έχει σχεδιαστεί για να υποκαταστήσει δοκιμή χρησιμοποιούμενη στην καθημερινή πρακτική και αποδεκτή για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας και/ή την εκτίμηση κινδύνου και η οποία, όπως έχει διαπιστωθεί, εξασφαλίζει ισοδύναμη ή βελτιωμένη προστασία της υγείας του ανθρώπου ή των ζώων ή του περιβάλλοντος, κατά περίπτωση, σε σύγκριση με την αποδεκτή δοκιμή, για όλες τις πιθανές περιπτώσεις δοκιμής και ελεγχόμενες χημικές ουσίες (9).

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών (9).

Δερματικός ερεθισμός: η πρόκληση αναστρέψιμων βλαβών στο δέρμα μετά την εφαρμογή ελεγχόμενης χημικής ουσίας για χρονικό διάστημα έως 4 ωρών. Ο δερματικός ερεθισμός είναι τοπική, μη ανοσογονική αντίδραση που εμφανίζεται σε σύντομο χρόνο μετά τη διέγερση (29). Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι ο αναστρέψιμος χαρακτήρας της, ο οποίος συνεπάγεται φλεγμονώδεις αντιδράσεις και τα περισσότερα τυπικά κλινικά σημεία ερεθισμού (ερύθημα, οίδημα, κνησμό και πόνο) που συνδέονται με φλεγμονή.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών ελεγχόμενων χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας των μεθόδων δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών (9).

Στρατηγική κλιμακωτών δοκιμών: διεξαγωγή δοκιμών κατά την οποία οι μέθοδοι δοκιμών εφαρμόζονται διαδοχικά. Η απόφαση επιλογής μεθόδου σε κάθε επόμενο επίπεδο δοκιμής λαμβάνεται με βάση τα αποτελέσματα του προηγουμένου επιπέδου (9).

Ελεγχόμενη χημική ουσία (καλούμενη επίσης «ελεγχόμενη ουσία»): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

▼M3

Προσάρτημα 2

Πρότυπα επιδόσεων για την αξιολόγηση προτεινόμενων παρεμφερών ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών δερματικού ερεθισμού in vitro σε μοντέλο ανασυσταθείσας ανθρώπινης επιδερμίδας (RhE)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Σκοπός των προτύπων για τις επιδόσεις είναι να παρέχουν τη βάση με την οποία είναι δυνατόν να διαπιστωθεί ότι νέες μέθοδοι —αποκλειστικές (δηλαδή κατοχυρωμένες με δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, με εμπορικά σήματα, με καταχώριση) και μη— διαθέτουν επαρκή ορθότητα και αξιοπιστία για συγκεκριμένες δοκιμές. Τα εν λόγω πρότυπα επιδόσεων βασίζονται σε επικυρωμένες και εγκεκριμένες μεθόδους και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας και της ορθότητας άλλων ανάλογων μεθόδων (καλούνται κοινώς «δοκιμές me-too»), οι οποίες στηρίζονται σε παρεμφερείς επιστημονικές αρχές και με τις οποίες μετράται ή προβλέπεται η ίδια βιολογική ή τοξική επίδραση (9).

2. Πριν από την υιοθέτηση τροποποιημένων μεθόδων, δηλαδή προτεινόμενων δυνητικών βελτιώσεων σε εγκεκριμένη μέθοδο, πρέπει να διενεργείται αξιολόγηση για να διαπιστωθούν οι επιδράσεις των προτεινόμενων αλλαγών στις επιδόσεις της δοκιμής και ο βαθμός στον οποίο οι εν λόγω αλλαγές επηρεάζουν τα στοιχεία που τροφοδοτούν τις υπόλοιπες συνιστώσες της διαδικασίας επικύρωσης. Ανάλογα με το πλήθος και το είδος των προτεινόμενων αλλαγών, τα δεδομένα που έχουν προκύψει και τα έγγραφα τεκμηρίωσης των εν λόγω αλλαγών, αυτές θα πρέπει να υποβάλλονται είτε στη διαδικασία επικύρωσης που περιγράφεται για τις νέες δοκιμές είτε, όπου ενδείκνυται, σε περιορισμένη εκτίμηση αξιοπιστίας και καταλληλότητας με τη βοήθεια καθιερωμένων προτύπων για τις επιδόσεις (9).

3. Οι παραλλαγές (me-too) ή τροποποιήσεις των τριών επικυρωμένων μεθόδων [μοντέλα RhE EpiSkin™ (επικυρωμένη μέθοδος αναφοράς – VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) και SkinEthic™] που προτείνεται να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών πρέπει να αξιολογούνται για να διαπιστωθούν η αξιοπιστία και η ορθότητά τους, με τη χρήση χημικών ουσιών που αντιπροσωπεύουν την πλήρη βαθμολογική κλίμακα ερεθιστικότητας Draize. Οι τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας που προκύπτουν για τις προτεινόμενες παρεμφερείς ή τροποποιημένες μεθόδους, όταν οι εν λόγω μέθοδοι αξιολογούνται με τη βοήθεια των 20 χημικών ουσιών αναφοράς που συνιστώνται στα πρότυπα επιδόσεων (πίνακας 1), πρέπει να είναι εφάμιλλες ή ανώτερες εκείνων της VRM (πίνακας 2) (2) (16). Οι τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας που πρέπει να επιτυγχάνονται παρατίθενται στις παραγράφους 8 έως 12 του παρόντος προσαρτήματος. Περιλαμβάνονται χημικές ουσίες μη ταξινομούμενες («Καμία κατηγορία» του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ) και ταξινομούμενες (κατηγορία 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ) (1), οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές τάξεις χημικών ουσιών, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση της αξιοπιστίας και της ορθότητας (ευαισθησία, ειδικότητα και συνολική ορθότητα) της προτεινόμενης μεθόδου με εκείνες της VRM. Πριν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος για δοκιμές νέων ελεγχόμενων χημικών ουσιών, πρέπει να προσδιορίζεται η ικανότητά της να αναγνωρίζει σωστά τις ερεθιστικές χημικές ουσίες της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ και, ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο για το οποίο προορίζονται τα δεδομένα, η ικανότητά της να χαρακτηρίζει σωστά τις χημικές ουσίες που δεν κατατάσσονται σε καμία κατηγορία βάσει του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ.

4. Τα παρόντα πρότυπα επιδόσεων βασίζονται στα πρότυπα του κέντρου ECVAM της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τις επιδόσεις (8), τα οποία επικαιροποιήθηκαν σύμφωνα με τα συστήματα ταξινόμησης και επισήμανσης GHS των Ηνωμένων Εθνών και CLP της ΕΕ (1) (3). Τα αρχικά πρότυπα επιδόσεων είχαν καθοριστεί μετά την ολοκλήρωση της μελέτης επικύρωσης (21) και βασίζονταν στο ενωσιακό σύστημα ταξινόμησης που θεσπίστηκε με την οδηγία 2001/59/ΕΚ της Επιτροπής της 6ης Αυγούστου 2001 σχετικά με την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο, για εικοστή όγδοη φορά, της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν στην ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών ([1]). Λόγω της

([1]) ΕΕ L 225 της 21.8.2001, σ. 1.

▼M3

υιοθέτησης του συστήματος ταξινόμησης και επισήμανσης GHS των Ηνωμένων Εθνών από την ΕΕ (CLP της ΕΕ) (3), η οποία μεσολάβησε ανάμεσα στην ολοκλήρωση της μελέτης επικύρωσης και στην οριστικοποίηση της παρούσας μεθόδου δοκιμών, τα πρότυπα επιδόσεων επικαιροποιήθηκαν (8). Η επικαιροποίηση αυτή αφορά κυρίως αλλαγές i) στη σειρά των χημικών ουσιών αναφοράς των προτύπων για τις επιδόσεις και ii) στις καθορισμένες τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας (2) (23).

ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΠΙΔΟΣΕΩΝ ΓΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΥ ΕΡΕΘΙΣΜΟΥ IN VITRO ΣΕ RhE

5. Τα πρότυπα επιδόσεων συνίστανται από τα ακόλουθα τρία στοιχεία (9):

I) Βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών

II) Κατάλογος ελάχιστων χημικών ουσιών αναφοράς

III) Καθορισμένες τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας

I) **Βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών**

6. Πρόκειται για τα βασικά δομικά, λειτουργικά και διαδικαστικά στοιχεία μιας επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών, τα οποία θα πρέπει να περιλαμβάνει το πρωτόκολλο της προτεινόμενης μεθόδου που είναι μηχανιστικά και λειτουργικά παρεμφερής ή τροποποιημένη. Στα εν λόγω συστατικά στοιχεία συγκαταλέγονται μοναδικά χαρακτηριστικά της μεθόδου, διαδικαστικές λεπτομέρειες κρίσιμης σημασίας και μέτρα ποιοτικού ελέγχου. Η τήρηση των βασικών συστατικών στοιχείων της μεθόδου δοκιμών συμβάλλει στο να εξασφαλίζεται ότι η προτεινόμενη παρεμφερής ή τροποποιημένη μέθοδος βασίζεται στις ίδιες θεωρητικές αρχές όπως η αντίστοιχη VRM (9). Τα βασικά συστατικά στοιχεία της μεθόδου δοκιμών περιγράφονται λεπτομερώς στις παραγράφους 16 έως 21 της παρούσας μεθόδου και οι δοκιμές πρέπει να διεξάγονται σύμφωνα με:

— τους γενικούς όρους (παράγραφος 16)

— τους λειτουργικούς όρους, οι οποίοι καλύπτουν τα εξής:

— τη βιωσιμότητα (παράγραφος 17),

— τη λειτουργία φραγμού (παράγραφος 18),

— τη μορφολογία (παράγραφος 19),

— την αναπαραγωγιμότητα (παράγραφος 20) και

— τον ποιοτικό έλεγχο (παράγραφος 21).

II) **Κατάλογος ελάχιστων χημικών ουσιών αναφοράς**

7. Οι χημικές ουσίες αναφοράς χρησιμοποιούνται προκειμένου να κριθεί αν η αξιοπιστία και η ορθότητα μιας προτεινόμενης παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου, η οποία είναι αποδεδειγμένα επαρκώς ομοειδής με τη VRM από δομικής και λειτουργικής πλευράς ή αποτελεί ήσσονος σημασίας τροποποίηση μιας από τις τρεις επικυρωμένες μεθόδους, είναι συγκρίσιμες με εκείνες της VRM ή ανώτερες (2) (8) (16) (23). Στις 20 συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς του πίνακα 1 περιλαμβάνονται ουσίες που αντιπροσωπεύουν, αφενός, διαφορετικές τάξεις χημικών ουσιών (δηλαδή κατηγορίες που βασίζονται στις δραστικές ομάδες) και, αφετέρου, την πλήρη βαθμολογική κλίμακα ερεθιστικότητας Draize (από μη ερεθιστικό έως ισχυρό ερεθιστικό). Ο κατάλογος αυτός περιέχει 10 χημικές ουσίες της κατηγορίας 2 του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ και 10 χημικές ουσίες που δεν κατατάσσονται σε καμία κατηγορία, από τις οποίες τρεις είναι ουσίες της προαιρετικής κατηγορίας 3 του GHS των Ηνωμένων Εθνών. Στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών, η προαιρετική κατηγορία 3 θεωρείται μη υφιστάμενη. Οι χημικές ουσίες του πίνακα 1 επιλέχθηκαν μεταξύ εκείνων οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο βελτιστοποίησης που ακολούθησε την προεπικύρωση, καθώς και στη μελέτη επικύρωσης της VRM, σε σχέση με τη χημική λειτουργικότητα και τη φυσική κατάσταση (14) (18). Οι εν λόγω ουσίες αναφοράς συνιστούν τον ελάχιστο αριθμό χημικών ουσιών που πρέπει να χρησιμοποιείται για την

▼M3

αξιολόγηση της ορθότητας και της αξιοπιστίας μιας προτεινόμενης παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου, αλλά δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη νέων μεθόδων. Σε περίπτωση που μια ουσία του καταλόγου δεν είναι διαθέσιμη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες ουσίες για τις οποίες υπάρχουν κατάλληλα δεδομένα αναφοράς από δοκιμές in vivo, επιλεγόμενες πρωτίστως μεταξύ των χημικών ουσιών οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο βελτιστοποίησης που ακολούθησε την προεπικύρωση ή στη μελέτη επικύρωσης της VRM. Εφόσον κρίνεται σκόπιμο, για την περαιτέρω αξιολόγηση της ορθότητας της προτεινόμενης μεθόδου, επιτρέπεται να προστίθενται στον κατάλογο ελαχίστων χημικών ουσιών αναφοράς επιπλέον ουσίες που αντιπροσωπεύουν άλλες τάξεις χημικών προϊόντων και για τις οποίες υπάρχουν κατάλληλα δεδομένα αναφοράς από δοκιμές in vivo.

Πίνακας 1

Κατάλογος ελάχιστων χημικών ουσιών αναφοράς για τον προσδιορισμό των τιμών ορθότητας και αξιοπιστίας παρεμφερών ή τροποποιημένων μεθόδων δοκιμών δερματικού ερεθισμού σε RhE [1]

Χημική ουσία	Αριθμός CAS	Φυσική κατάσταση	Βαθμολογία σε δοκιμές in vivo	Κατηγορία in vitro κατά τη VRM	Κατηγορία in vivo κατά το GHS των Ην. Εθνών/CLP της ΕΕ
1-βρωμο-4-χλωρο-βουτάνιο	6940-78-9	Υγρό	0	Κατηγορία 2	Καμία
φθαλικό διαιθύλιο	84-66-2	Υγρό	0	Καμία	Καμία
ναφθαλινοξικό οξύ	86-87-3	Στερεό	0	Καμία	Καμία
φαινοξυοξικό αλλύλιο	7493-74-5	Υγρό	0,3	Καμία	Καμία
ισοπροπανόλη	67-63-0	Υγρό	0,3	Καμία	Καμία
4-(μεθυλοθειο)-βενζαλδεΰδη	3446-89-7	Υγρό	1	Κατηγορία 2	Καμία
στεατικό μεθύλιο	112-61-8	Στερεό	1	Καμία	Καμία
βουτυρικό επτύλιο	5870-93-9	Υγρό	1,7	Καμία	Καμία
σαλικυλικό εξύλιο	6259-76-3	Υγρό	2	Καμία	Καμία
κιναμμωμαλδεΰδη	104-55-2	Υγρό	2	Κατηγορία 2	Καμία *(Προαιρετική κατηγορία 3)* [3]
δεκανόλη-1 [2]	*112-30-1*	*Υγρό*	*2,3*	*Κατηγορία 2*	*Κατηγορία 2*
κυκλαμιναλδεΰδη	103-95-7	Υγρό	2,3	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
1-βρωμοεξάνιο	111-25-1	Υγρό	2,7	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
Υδροχλωρική 2-χλωρομεθυλο-3,5-διμεθυλο-4-μεθοξυπυριδίνη	86604-75-3	Στερεό	2,7	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
δι-κ-προπυλο-δισουλφίδιο [2]	*629-19-6*	*Υγρό*	*3*	*Καμία*	*Κατηγορία 2*
υδροξείδιο του καλίου (υδατικό διάλυμα 5 %)	1310-58-3	Υγρό	3	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
5-(1,1-διμεθυλαιθυλο)-2-μεθυλο-βενζολοθειόλη	7340-90-1	Υγρό	3,3	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
1-μεθυλο-3-φαινυλο-1-πιπεραζίνη	5271-27-2	Στερεό	3,3	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2

▼M3

Χημική ουσία	Αριθμός CAS	Φυσική κατάσταση	Βαθμολογία σε δοκιμές in vivo	Κατηγορία in vitro κατά τη VRM	Κατηγορία in vivo κατά το GHS των Ην. Εθνών/CLP της ΕΕ
επτανάλη	111-71-7	Υγρό	3,4	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2
Τετραχλωροαιθυλένιο	127-18-4	Υγρό	4	Κατηγορία 2	Κατηγορία 2

([1]) Η επιλογή των χημικών ουσιών βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια: i) οι χημικές ουσίες κυκλοφορούν στο εμπόριο, ii) αντιπροσωπεύουν την πλήρη βαθμολογική κλίμακα ερεθιστικότητας Draize (από μη ερεθιστικό έως ισχυρό ερεθιστικό), iii) έχουν σαφώς καθορισμένη χημική δομή, iv) είναι αντιπροσωπευτικές της χημικής λειτουργικότητας που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία επικύρωσης και v) δεν τους αποδίδονται άκρως τοξικά χαρακτηριστικά (π.χ. καρκινογόνες ή τοξικές για το αναπαραγωγικό σύστημα) και το κόστος διάθεσης των αποβλήτων τους δεν θεωρείται απαγορευτικό.

([2]) Χημικές ουσίες ερεθιστικές για το κουνέλι, οι οποίες όμως, σύμφωνα με αξιόπιστα διαθέσιμα στοιχεία, δεν είναι ερεθιστικές για τον άνθρωπο (31) (32) (33).

([3]) Στο GHS των Ηνωμένων Εθνών αλλά όχι στο CLP της ΕΕ.

III) **Καθορισμένες τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας**

8. Για τη διαπίστωση της αξιοπιστίας και της ορθότητας των προτεινόμενων παρεμφερών ή τροποποιημένων μεθόδων που προορίζονται για μεταφορά μεταξύ εργαστηρίων, πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή, σε τρία τουλάχιστον εργαστήρια, και οι 20 χημικές ουσίες αναφοράς του πίνακα 1. Εάν όμως η προτεινόμενη μέθοδος πρόκειται να χρησιμοποιείται μόνο σε ένα εργαστήριο, δεν απαιτείται πολυεργαστηριακή δοκιμή για την επικύρωση. Ωστόσο, έχει θεμελιώδη σημασία η ανεξάρτητη αξιολόγηση των εν λόγω μελετών επικύρωσης από διεθνώς αναγνωρισμένους οργανισμούς επικύρωσης, σύμφωνα με διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές (9). Κάθε εργαστήριο πρέπει να υποβάλλει σε δοκιμή και τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς, εκτελώντας τρεις χωριστές μετρήσεις με διαφορετικές παρτίδες ιστού και με επαρκή χρονική απόσταση μεταξύ τους. Κάθε μέτρηση πρέπει να συνίσταται στην ταυτόχρονη δοκιμή τριών τουλάχιστον πανομοιότυπων δειγμάτων ιστού για κάθε ελεγχόμενη ουσία, θετικό μάρτυρα και αρνητικό μάρτυρα που συμπεριλαμβάνονται σε αυτή.

9. Οι τιμές αξιοπιστίας και ορθότητας της προτεινόμενης μεθόδου πρέπει να υπολογίζονται με συνεκτίμηση και των τεσσάρων κατωτέρω κριτηρίων, τα οποία εξασφαλίζουν τον υπολογισμό των τιμών αξιοπιστίας και καταλληλότητας με προκαθορισμένο και σταθερό τρόπο:

   1. Μόνο τα δεδομένα από μετρήσεις πλήρων σειρών μετρήσεων πληρούν τις προϋποθέσεις για τον υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής μεταβλητότητας της μεθόδου και της προγνωστικής της ικανότητας (ορθότητα).

   2. Κάθε συμμετέχον εργαστήριο πρέπει να καταλήγει στην τελική ταξινόμηση κάθε χημικής ουσίας αναφοράς χρησιμοποιώντας τη μέση τιμή βιωσιμότητας που προκύπτει από τις διάφορες μετρήσεις μιας πλήρους σειράς μετρήσεων.

   3. Μόνο τα δεδομένα που προκύπτουν για χημικές ουσίες για τις οποίες οι σειρές μετρήσεων είναι πλήρεις σε όλα τα συμμετέχοντα εργαστήρια πληρούν τις προϋποθέσεις για τον υπολογισμό της διεργαστηριακής μεταβλητότητας της μεθόδου.

   4. Οι τιμές ορθότητας πρέπει να υπολογίζονται με βάση τις προβλέψεις των διαφόρων συμμετεχόντων εργαστηρίων για καθεμία από τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς.

   Στο πλαίσιο αυτό, μια **σειρά μετρήσεων** αποτελείται από τρεις χωριστές μετρήσεις που εκτελεί ένα εργαστήριο για μια ελεγχόμενη χημική ουσία. **Πλήρης σειρά μετρήσεων** είναι η σειρά μετρήσεων ενός εργαστηρίου για μία ελεγχόμενη χημική ουσία, της οποίας και οι τρεις μετρήσεις είναι έγκυρες. Αυτό συνεπάγεται ότι κάθε άκυρη μέτρηση ακυρώνει ολόκληρη τη σειρά των τριών μετρήσεων.

Ενδοργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

10. Από την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας πρέπει να προκύπτει συμφωνία μεγαλύτερη ή ίση με (≥) 90 % μεταξύ των ταξινομήσεων (κατηγορία 2 και καμία κατηγορία του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ) τις οποίες είχαν ως αποτέλεσμα οι διαφορετικές ανεξάρτητες μετρήσεις με τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς στο ίδιο εργαστήριο.

▼M3

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

11. Η εκτίμηση της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας δεν είναι απαραίτητη εάν η προτεινόμενη μέθοδος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μόνο σε ένα εργαστήριο. Για τη μεταφορά μεθόδου μεταξύ εργαστηρίων, η συμφωνία μεταξύ των ταξινομήσεων (κατηγορία 2 και «καμία κατηγορία» του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ) τις οποίες είχαν ως αποτέλεσμα οι διαφορετικές ανεξάρτητες μετρήσεις με τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς τουλάχιστον σε τρία, κατά προτίμηση, εργαστήρια πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση με (≥) 80 %.

Προγνωστική ικανότητα (ορθότητα)

12. Η ορθότητα (ευαισθησία, ειδικότητα και συνολική ορθότητα) της προτεινόμενης παρεμφερούς ή τροποποιημένης μεθόδου πρέπει να είναι συγκρίσιμη με εκείνη της VRM ή ανώτερη, λαμβανομένων υπόψη συμπληρωματικών πληροφοριών σχετικά με την καταλληλότητα για το είδος που ενδιαφέρει (πίνακας 2). Η ευαισθησία πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση με (≥) 80 % (2) (8) (23). Ωστόσο, για την ευαισθησία της προτεινόμενης μεθόδου in vitro ισχύει ο πρόσθετος ειδικός περιορισμός ότι επιτρέπεται η εσφαλμένη ταξινόμηση μόνο δύο χημικών ουσιών της κατηγορίας 2 in vivo —*δεκανόλη-1* και *δι-κ-προπυλο-δισουλφίδιο*— ως «Καμία κατηγορία» από περισσότερα του ενός συμμετέχοντα εργαστήρια. Η ειδικότητα πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση με (≥) 70 % (2) (8) (23). Δεν ισχύει άλλος περιορισμός για την ειδικότητα της προτεινόμενης μεθόδου in vitro, δηλαδή επιτρέπεται η εσφαλμένη ταξινόμηση οποιασδήποτε χημικής ουσίας που δεν κατατάσσεται σε καμία κατηγορία in vivo από οποιοδήποτε συμμετέχον εργαστήριο, εφόσον η τελική ειδικότητα της μεθόδου δοκιμών παραμένει εντός του αποδεκτού εύρους τιμών. Η συνολική ορθότητα πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση με (≥) 75 % (2) (8) (23). Παρόλο που η ευαισθησία της VRM, η οποία έχει υπολογιστεί για τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς του πίνακα 1, ισούται με 90 %, η απαιτούμενη ελάχιστη τιμή ευαισθησίας για να θεωρηθεί έγκυρη μια παρεμφερής ή τροποποιημένη μέθοδος καθορίζεται σε 80 %, επειδή είναι γνωστό ότι τόσο η *δεκανόλη-1* (χημική ουσία οριακού αποτελέσματος), όσο και το *δι-κ-προπυλο-δισουλφίδιο* (ψευδαρνητικό αποτέλεσμα με τη VRM) δεν είναι ερεθιστικές για τον άνθρωπο (31) (32) (33), αν και έχουν χαρακτηριστεί ερεθιστικές με τη δοκιμή σε κουνέλια. Δεδομένου ότι τα μοντέλα RhE βασίζοντα σε ανθρώπινα κύτταρα, μπορεί να χαρακτηρίσουν μη ερεθιστικές τις συγκεκριμένες χημικές ουσίες («Καμία κατηγορία» του GHS των Ηνωμένων Εθνών/CLP της ΕΕ).

Πίνακας 2

Απαιτούμενες προγνωστικές τιμές ευαισθησίας, ειδικότητας και συνολικής ορθότητας για να θεωρηθεί έγκυρη μια παρεμφερής ή τροποποιημένη μέθοδος

Ευαισθησία	Ειδικότητα	Συνολική ορθότητα
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Κριτήρια αποδοχής της μελέτης

13. Μία ή περισσότερες δοκιμές με μία ή περισσότερες ελεγχόμενες ουσίες είναι πιθανόν να μην πληρούν τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής για την ελεγχόμενη ουσία και τους μάρτυρες και/ή να μην είναι αποδεκτές για άλλους λόγους. Για τη συμπλήρωση κενών στα δεδομένα, μπορούν να επιτραπούν δύο επιπλέον δοκιμές κατ' ανώτατο όριο για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία («επαναδοκιμή»). Για την ακρίβεια, καθώς επιβάλλεται ο ταυτόχρονος έλεγχος και θετικού και αρνητικού μάρτυρα σε περίπτωση επαναδοκιμής, επιτρέπεται η εκτέλεση δύο επιπλέον μετρήσεων κατ' ανώτατο όριο για κάθε ελεγχόμενη χημική ουσία.

14. Θεωρητικά, ακόμη και μετά από επαναδοκιμή, είναι δυνατόν να μην επιτύχει κάθε συμμετέχον εργαστήριο, για όλες τις χημικές ουσίες αναφοράς, τον απαιτούμενο ελάχιστο αριθμό τριών έγκυρων μετρήσεων ανά ελεγχόμενη χημική ουσία, με αποτέλεσμα να είναι ελλιπής ο πίνακας δεδομένων. Στις περιπτώσεις αυτές, για να θεωρηθούν αποδεκτές οι σειρές δεδομένων, πρέπει να πληρούνται σωρευτικά τα ακόλουθα τρία κριτήρια:

    1. Πρέπει να υπάρχει τουλάχιστον μία πλήρης σειρά μετρήσεων και για τις 20 χημικές ουσίες αναφοράς.

▼**M3**

2. Σε καθένα από τα τρία συμμετέχοντα εργαστήρια, τουλάχιστον το 85 % των σειρών μετρήσεων πρέπει να είναι πλήρεις (δηλαδή, για 20 ουσίες, επιτρέπονται 3 άκυρες σειρές μετρήσεων ανά εργαστήριο).

3. Τουλάχιστον το 90 % του συνόλου των δυνατών σειρών μετρήσεων σε τρία τουλάχιστον εργαστήρια πρέπει να είναι πλήρεις (δηλαδή, για 20 χημικές ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμή σε τρία εργαστήρια, επιτρέπονται συνολικά 6 άκυρες σειρές μετρήσεων).

▼M2

B. 47 **ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΑΔΙΑΦΑΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΒΟΟΕΙΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΣΧΥΡΩΝ ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η μέθοδος δοκιμών αδιαφάνειας (θολερότητας) και διαπερατότητας του κερατοειδούς βοοειδών (Bovine Corneal Opacity and Permeability/BCOP) αποτελεί μέθοδο δοκιμών *in vitro* που μπορεί να χρησιμοποιείται, υπό συγκεκριμένες περιστάσεις και περιορισμούς, για την ταξινόμηση ουσιών και μειγμάτων ως «διαβρωτικών και ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών» (1) (2) (3). Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών, ως ισχυρά ερεθιστικά ορίζονται οι ουσίες οι οποίες προκαλούν οφθαλμικές αλλοιώσεις που εμμένουν στο κουνέλι για τουλάχιστον 21 ημέρες μετά τη χορήγηση. Αν και δεν θεωρείται έγκυρη για την πλήρη αντικατάσταση της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια, η μέθοδος BCOP συνιστάται για χρήση στο πλαίσιο μιας στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών για τη κανονιστική ταξινόμηση και επισήμανση εντός συγκεκριμένου πεδίου εφαρμογής (4) (5). Οι ουσίες και τα μείγματα ελέγχου (6) μπορούν να ταξινομούνται ως διαβρωτικά ή ισχυρά ερεθιστικά για τους οφθαλμούς χωρίς περαιτέρω δοκιμές σε κουνέλια. Μια ουσία που εμφανίζει αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή σε κουνέλια στο πλαίσιο στρατηγικής διαδοχικών ελέγχων, όπως περιγράφεται στην κατευθυντήρια γραμμή 405 (7) του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (κεφάλαιο Β. 5 του παρόντος παραρτήματος).

2. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η περιγραφή των διαδικασιών που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της πιθανής διαβρωτικότητας ή ισχυρής ερεθιστικότητας μιας ελεγχόμενης ουσίας για τους οφθαλμούς, όπως μετράται από την ικανότητά της να προκαλεί αδιαφάνεια και αυξημένη διαπερατότητα σε απομονωμένο βόειο κερατοειδή. Οι τοξικές επιδράσεις στον κερατοειδή μετρώνται μέσω: (i) της μειωμένης μετάδοσης του φωτός (αδιαφάνεια) και (ii) της αυξημένης διέλευσης χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης (διαπερατότητα). Οι αξιολογήσεις της αδιαφάνειας και της διαπερατότητας του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης σε ελεγχόμενη ουσία συνδυάζονται για να εξαχθεί βαθμολογία ερεθιστικότητας *in vitro* (In Vitro Irritancy Score/IVIS), η οποία χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση του βαθμού ερεθιστικότητας της ελεγχόμενης ουσίας.

3. Σε δοκιμές με τη μέθοδο BCOP έχουν υποβληθεί και ερεθιστικά των οφθαλμών που προκαλούν αλλοιώσεις οι οποίες υποχωρούν εντός διαστήματος μικρότερου των 21 ημερών, καθώς και μη ερεθιστικά. Πάντως, δεν έχει αξιολογηθεί επισήμως η ορθότητα και η αξιοπιστία της μεθόδου δοκιμής BCOP για ουσίες που εμπίπτουν σε αυτές τις κατηγορίες.

4. Στο προσάρτημα 1 παρέχονται ορισμοί.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στο πρωτόκολλο της μεθόδου δοκιμών BCOP της Διυπηρεσιακής Συντονιστικής Επιτροπής για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ICCVAM)(8), το οποίο καταρτίστηκε σύμφωνα με διεθνή μελέτη επικύρωσης (4)(5)(9), με τη συνεισφορά του Ευρωπαϊκού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM) και του Ιαπωνικού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων(JaCVAM). Το πρωτόκολλο βασίζεται σε στοιχεία που ελήφθησαν από το Ινστιτούτο Επιστημών In Vitro (IIVS) και το πρωτόκολλο INVITTOX 124 (10), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη προεπικύρωσης της δοκιμασίας BCOP που διενεργήθηκε κατά την περίοδο 1997-1998 με κοινοτική χρηματοδότηση. Αμφότερα αυτά τα πρωτόκολλα βασίζονται στη μεθοδολογία της δοκιμασίας BCOP που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Gautheron *et al.* (11).

▼M2

6. Οι περιορισμοί που προσδιορίστηκαν για την παρούσα μέθοδο δοκιμών βασίζονται στα υψηλά ψευδοθετικά ποσοστά για τις αλκοόλες και τις κετόνες και στο υψηλό ψευδοαρνητικό ποσοστό για τα στερεά, που προέκυψαν από τη βάση δεδομένων επικύρωσης (βλ. παράγραφο 44) (5). Όταν οι ουσίες που εμπίπτουν σε αυτές τις χημικές και φυσικές κατηγορίες αποκλείονται από τη βάση δεδομένων, αυξάνεται σημαντικά η ορθότητα της δοκιμής BCOP στα συστήματα ταξινόμησης της ΕΕ, της EPA (Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ) και του GHS (Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων) (5). Για τον σκοπό της παρούσας δοκιμασίας (δηλ. τη ταυτοποίηση μόνο των διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών), τα ψευδοαρνητικά ποσοστά δεν είναι κρίσιμης σημασίας, διότι οι ουσίες αυτές θα υποβληθούν ακολούθως σε δοκιμή σε κουνέλια ή σε άλλες επαρκώς επικυρωμένες δοκιμές *in vitro*, ανάλογα με τις ρυθμιστικές απαιτήσεις, στο πλαίσιο στρατηγικής διαδοχικών ελέγχων με μέθοδο προσέγγισης βασιζόμενη στο βάρος της απόδειξης. Επιπλέον, η υφιστάμενη βάση δεδομένων επικύρωσης δεν καθιστά εφικτή τη δέουσα αξιολόγηση ορισμένων κατηγοριών χημικών ουσιών ή προϊόντων (π.χ. των μειγμάτων). Παρόλα αυτά, οι ερευνητές θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν την παρούσα μέθοδο δοκιμών για κάθε τύπο υλικού δοκιμής (συμπεριλαμβανομένων των μειγμάτων), με τα θετικά αποτελέσματα να θεωρούνται ενδεικτικά απόκρισης οφθαλμικής διαβρωτικότητας ή ισχυρής ερεθιστικότητας. Πάντως, τα θετικά αποτελέσματα που λαμβάνονται με αλκοόλες ή κετόνες πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή λόγω του κινδύνου υπερεκτιμημένης πρόβλεψης.

7. Όλες οι διαδικασίες με τους οφθαλμούς και τους κερατοειδείς βοοειδών πρέπει να συμμορφώνονται προς τους κανονισμούς και τις διαδικασίες που εφαρμόζονται στην εγκατάσταση δοκιμής για τον χειρισμό υλικών ζωικής προέλευσης, περιλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, ιστών και ιστικών υγρών. Συνιστάται η τήρηση των γενικών εργαστηριακών προφυλάξεων (12).

8. Ένας περιορισμός της μεθόδου δοκιμών είναι ότι, αν και λαμβάνει υπόψη ορισμένες από τις επιδράσεις στους οφθαλμούς οι οποίες αξιολογήθηκαν στη μέθοδο δοκιμών οφθαλμικής ερεθιστικότητας σε κουνέλια και, εν μέρει, τη σοβαρότητά τους, δεν λαμβάνει υπόψη τους τραυματισμούς του επιπεφυκότος και της ίριδας. Επίσης, μολονότι δεν είναι εφικτή η αξιολόγηση αυτής καθαυτής της αναστρεψιμότητας των αλλοιώσεων του κερατοειδούς στο πλαίσιο της δοκιμασίας BCOP, έχει προταθεί, βάσει των οφθαλμικών μελετών σε κουνέλια, η αξιολόγηση του αρχικού βάθους του τραύματος του κερατοειδούς για τη διάκριση μεταξύ μη αναστρέψιμων και αναστρέψιμων επιδράσεων (13). Τέλος, η BCOP δεν καθιστά εφικτή την αξιολόγηση του δυναμικού συστημικής τοξικότητας που συνδέεται με την έκθεση των οφθαλμών.

9. Συνεχίζονται οι προσπάθειες για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της χρησιμότητας και των περιορισμών της δοκιμασίας BCOP ως προς τον προσδιορισμό των μη ισχυρών ερεθιστικών και των μη ερεθιστικών ουσιών (βλ. επίσης παράγραφο 45). Οι χρήστες ενθαρρύνονται επίσης να παρέχουν δείγματα ή/και δεδομένα σε φορείς επικύρωσης, για μια επίσημη αξιολόγηση των πιθανών μελλοντικών χρήσεων της μεθόδου δοκιμών BCOP, καθώς και για την ταυτοποίηση των μη ισχυρών ερεθιστικών και των μη ερεθιστικών.

10. Τα εργαστήρια που εκτελούν για πρώτη φορά τη συγκεκριμένη δοκιμασία πρέπει να χρησιμοποιούν τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας που προβλέπονται στο προσάρτημα 2. Τα εργαστήρια μπορούν να χρησιμοποιούν αυτές τις χημικές ουσίες για να αποδείξουν την τεχνική ικανότητά τους όσον αφορά την εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών BCOP πριν από την υποβολή δεδομένων από τη δοκιμασία BCOP, για τη κανονιστική ταξινόμηση των κινδύνων.

ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

11. Η μέθοδος δοκιμών BCOP είναι ένα οργανοτυπικό μοντέλο που εξασφαλίζει βραχυπρόθεσμη διατήρηση της κανονικής φυσιολογικής και βιοχημικής λειτουργίας του βόειου κερατοειδούς *in vitro*. Στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών, η βλάβη που προκαλείται από την ελεγχόμενη ουσία αξιολογείται μέσω ποσοτικών μετρήσεων των μεταβολών στην αδιαφάνεια (θολερότητα) και στη διαπερατότητα του κερατοειδούς, με τη χρήση αδιαφανομέτρου και φασματοφωτομέτρου ορατού φωτός, αντιστοίχως. Αμφότερες οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό βαθμολογίας ερεθιστικότητας *in vitro* (IVIS), η οποία χρησιμοποιείται για την κατάταξη σε κατηγορία ταξινόμησης κινδύνου ερεθιστικότητας *in vitro*, με σκοπό την πρόβλεψη του δυναμικού οφθαλμικού ερεθισμού *in vivo* για την ελεγχόμενη ουσία (βλ. κριτήρια απόφασης).

▼M2

12. Στη μέθοδο δοκιμής BCOP χρησιμοποιούνται κερατοειδείς που απομονώνονται από τους οφθαλμούς προσφάτως σφαχθέντων βοοειδών. Η κερατοειδική αδιαφάνεια μετράται ποσοτικά ως η ποσότητα φωτός που μεταδίδεται μέσω του κερατοειδούς. Η διαπερατότητα μετράται ποσοτικά ως η ποσότητα χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης που διέρχεται από το πλήρες πάχος του κερατοειδούς, όπως ανιχνεύεται στο θρεπτικό υλικό του οπίσθιου θαλάμου. Οι ελεγχόμενες ουσίες εφαρμόζονται στην επιθηλιακή επιφάνεια του κερατοειδούς με προσθήκη στον εμπρόσθιο θάλαμο της διάταξης συγκράτησης του κερατοειδούς. Στο προσάρτημα 3 παρατίθεται περιγραφή και διάγραμμα διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς που χρησιμοποιείται στη μέθοδο δοκιμής BCOP. Οι διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς κυκλοφορούν στο εμπόριο ή κατασκευάζονται κατά παραγγελία.

Προέλευση και ηλικία των οφθαλμών βοοειδών και επιλογή ζωικών ειδών

13. Τα βοοειδή που αποστέλλονται στα σφαγεία θανατώνονται συνήθως για κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για άλλες εμπορικές χρήσεις. Οι κερατοειδείς που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο δοκιμής BCOP προέρχονται μόνο από υγιή ζώα που θεωρούνται κατάλληλα για είσοδο στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα. Δεδομένου ότι το βάρος των βοοειδών ποικίλλει ανάλογα με τη φυλή, την ηλικία και το φύλο, δεν υπάρχει συνιστώμενο βάρος του ζώου κατά τη σφαγή.

14. Όταν χρησιμοποιούνται οφθαλμοί ζώων διαφορετικών ηλικιών ενδέχεται να προκύψουν διακυμάνσεις των διαστάσεων του κερατοειδούς. Οι κερατοειδείς με οριζόντια διάμετρο > 30,5 mm και κεντρικό πάχος (CCT) ≥ 1 100 μm προέρχονται γενικά από βοοειδή ηλικίας άνω των οκτώ ετών, ενώ οι κερατοειδείς με οριζόντια διάμετρο < 28,5 mm και CCT < 900 μm προέρχονται συνήθως από βοοειδή ηλικίας κάτω των πέντε ετών (14). Για τον λόγο αυτό, συνήθως δεν χρησιμοποιούνται οφθαλμοί βοοειδών ηλικίας άνω των 60 μηνών. Κατά κανόνα δεν χρησιμοποιούνται ούτε οφθαλμοί βοοειδών ηλικίας κάτω των 12 μηνών, διότι οι οφθαλμοί αυτοί δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως και το πάχος και η διάμετρος του κερατοειδούς υπολείπονται σημαντικά των τιμών που αναφέρονται σε οφθαλμούς ενήλικων βοοειδών. Εντούτοις, επιτρέπεται η χρήση κερατοειδών νεαρών ζώων (6 έως 12 μηνών) επειδή παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως η αυξημένη διαθεσιμότητα, το περιορισμένο ηλικιακό εύρος και οι μειωμένοι κίνδυνοι πιθανής έκθεσης των εργαζομένων στη σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (15). Δεδομένου ότι κρίνεται σκόπιμη η περαιτέρω αξιολόγηση της επίδρασης του μεγέθους ή του πάχους του κερατοειδούς στον βαθμό απόκρισης στις διαβρωτικές και ερεθιστικές ουσίες, συνιστάται στους χρήστες να αναφέρουν την εκτιμώμενη ηλικία ή/και το βάρος των ζώων από τα οποία προέρχονται οι κερατοειδείς που χρησιμοποιούνται στις μελέτες.

Συλλογή και μεταφορά των οφθαλμών στο εργαστήριο

15. Οι οφθαλμοί συλλέγονται από υπαλλήλους των σφαγείων. Για την ελαχιστοποίηση μηχανικών και άλλων φθορών των οφθαλμών, οι οφθαλμοί πρέπει να εξορύσσονται το συντομότερο μετά τη θανάτωση. Για την αποφυγή έκθεσης των οφθαλμών σε πιθανώς ερεθιστικές ουσίες, οι υπάλληλοι των σφαγείων δεν πρέπει να χρησιμοποιούν απορρυπαντικά κατά την έκπλυση της κεφαλής των ζώων.

16. Οι οφθαλμοί πρέπει να εμβαπτίζονται πλήρως σε διάλυμα αλάτων Hank (Hanks' Balanced Salt Solution/HBSS) εντός δοχείου κατάλληλου μεγέθους και να μεταφέρονται στο εργαστήριο κατά τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται η υποβάθμιση ή/και η βακτηριδιακή μόλυνση. Επειδή οι οφθαλμοί συλλέγονται κατά τη διαδικασία σφαγής, ενδέχεται να εκτεθούν σε αίμα και σε άλλες βιολογικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των βακτηριδίων και άλλων μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να διασφαλίζεται η ελαχιστοποίηση του κινδύνου μόλυνσης (π.χ. με τη φύλαξη του δοχείου που περιέχει τους οφθαλμούς σε υγρό πάγο, την προσθήκη αντιβιοτικών στο διάλυμα HBSS που χρησιμοποιείται για τη φύλαξη των οφθαλμών κατά τη μεταφορά [π.χ. 100 IU πενικιλίνης/mL και 100 μg στρεπτομυκίνης/mL]).

▼M2

17. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της συλλογής των οφθαλμών και της χρήσης των κερατοειδών στη μέθοδο δοκιμής BCOP πρέπει να είναι το μικρότερο δυνατόν (κατά κανόνα η συλλογή και η χρήση πρέπει να γίνονται την ίδια ημέρα) και να αποδεικνύεται ότι δεν υπονομεύει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα αυτά βασίζονται στα κριτήρια επιλογής των οφθαλμών, καθώς και στις αποκρίσεις των θετικών και των αρνητικών μαρτύρων. Όλοι οι οφθαλμοί που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία πρέπει να προέρχονται από την ίδια ομάδα οφθαλμών που συλλέχθηκαν συγκεκριμένη ημέρα.

Κριτήρια επιλογής των οφθαλμών που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο δοκιμής BCOP

18. Μόλις οι οφθαλμοί φτάσουν στο εργαστήριο, εξετάζονται προσεκτικά για ελαττώματα όπως αυξημένη αδιαφάνεια, αμυχές και νεοαγγείωση. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο κερατοειδείς χωρίς ελαττώματα αυτού του είδους.

19. Η ποιότητα κάθε κερατοειδούς αξιολογείται και σε μεταγενέστερα στάδια της δοκιμασίας. Οι κερατοειδείς με αδιαφάνεια μεγαλύτερη των επτά μονάδων (ΣΗΜΕΙΩΣΗ: το αδιαφανόμετρο πρέπει να διακριβώνεται βάσει των προτύπων αδιαφάνειας που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό των μονάδων αδιαφάνειας, βλ. προσάρτημα 3) μετά από αρχική εξισορρόπηση διάρκειας μίας ώρας, πρέπει να απορρίπτονται.

20. Κάθε ομάδα οφθαλμών που υποβάλλεται σε αγωγή (ελεγχόμενη ουσία, παράλληλοι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες) αποτελείται από τουλάχιστον τρεις οφθαλμούς. Στη δοκιμασία BCOP, για τους αρνητικούς μάρτυρες πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις κερατοειδείς. Δεδομένου ότι όλοι οι κερατοειδείς εκτέμνονται από τον πλήρη βολβό και στερεώνονται στους θαλάμους της διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς, υπάρχει το ενδεχόμενο να εμφανιστούν τεχνητά σφάλματα (artefact) στις επιμέρους τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας του κερατοειδούς (συμπεριλαμβανομένου του αρνητικού μάρτυρα) λόγω του χειρισμού. Επιπλέον, οι τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας που λαμβάνονται από τους κερατοειδείς-αρνητικούς μάρτυρες χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση των τιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας του κερατοειδούς του δοκιμίου και των θετικών μαρτύρων στους υπολογισμούς της IVIS.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Προετοιμασία των οφθαλμών

21. Κερατοειδείς χιτώνες χωρίς ελαττώματα ανατέμνονται κατά τρόπο ώστε να παραμένει δακτύλιος σκληρού χιτώνα 2 έως 3 mm με σκοπό τη διευκόλυνση του επακόλουθου χειρισμού, λαμβανομένης μέριμνας για την αποφυγή φθορών στο κερατοειδικό επιθήλιο και ενδοθήλιο. Οι απομονωθέντες κερατοειδείς στερεώνονται σε ειδικές διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς που αποτελούνται από εμπρόσθιο και οπίσθιο διαμέρισμα, τα οποία εφάπτονται με το επιθήλιο και το ενδοθήλιο του κερατοειδούς, αντιστοίχως. Αμφότεροι οι θάλαμοι πληρώνονται μέχρι υπερχείλισης με προθερμασμένο θρεπτικό υλικό ελάχιστων τροφικών απαιτήσεων Eagle (Eagle's Minimum Essential Medium/EMEM) (πρώτα ο οπίσθιος θάλαμος), κατά τρόπο ώστε να μη σχηματίζονται φυσαλίδες. Η διάταξη αφήνεται εν συνεχεία να σταθεροποιηθεί στους 32 ± 1 °C για τουλάχιστον μία ώρα ούτως ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία των κερατοειδών με τη θερμοκρασία του θρεπτικού υλικού και να επιτευχθεί, στο μέτρο του δυνατού, φυσιολογική μεταβολική δραστηριότητα (η θερμοκρασία της επιφάνειας του κερατοειδούς *in vivo* είναι κατά προσέγγιση 32 °C).

22. Μετά την παρέλευση του διαστήματος εξισορρόπησης, προστίθεται φρέσκο προθερμασμένο EMEM σε αμφότερους τους θαλάμους και για κάθε κερατοειδή σημειώνονται οι αρχικές ενδείξεις αδιαφάνειας. Οι κερατοειδείς που εμφανίζουν μακροσκοπικές βλάβες ιστού (π.χ. αμυχές, χρώση, νεοαγγείωση) ή αδιαφάνεια > 7 μονάδων απορρίπτονται. Υπολογίζεται η μέση αδιαφάνεια όλων των εξισορροπημένων κερατοειδών. Τουλάχιστον τρεις κερατοειδείς με τιμές αδιαφάνειας που προσεγγίζουν τη διάμεση τιμή για όλους τους κερατοειδείς επιλέγονται ως αρνητικοί μάρτυρες (ή ως μάρτυρες με διαλύτη). Οι εναπομένοντες κερατοειδείς κατανέμονται στη συνέχεια σε ομάδες αγωγής ή θετικών μαρτύρων.

▼M2

23. Επειδή η θερμοχωρητικότητα του νερού είναι υψηλότερη από του αέρα, το νερό παρέχει πιο σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας για επώαση. Κατά συνέπεια, για τη διατήρηση της διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς και του περιεχομένου της σε θερμοκρασία 32 ± 1 °C συνιστάται η χρήση υδατόλουτρου. Εντούτοις, μπορούν να χρησιμοποιούνται και επωαστήρες αέρα, με προφυλάξεις για τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας (π.χ. με προθέρμανση των διατάξεων συγκράτησης και των θρεπτικών υλικών).

Εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας

24. Χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πρωτόκολλα αγωγής, ένα για υγρά και επιφανειοδραστικά (στερεά ή υγρά) και ένα για μη επιφανειοδραστικά στερεά.

25. Τα υγρά υποβάλλονται σε δοκιμή χωρίς αραίωση, ενώ τα επιφανειοδραστικά υποβάλλονται σε δοκιμή σε συγκέντρωση 10 % w/v σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9 %, σε αποσταγμένο νερό ή σε άλλο διαλύτη για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής. Τα ημιστερεά, οι κρέμες και οι κηροί υποβάλλονται κατά κανόνα σε δοκιμή ως υγρά. Για διαφορετικές αραιώσεις πρέπει να παρέχεται κατάλληλη αιτιολόγηση. Οι κερατοειδείς εκτίθενται στα υγρά και στα επιφανειοδραστικά επί 10 λεπτά. Σε περίπτωση διαφορετικής διάρκειας έκθεσης, πρέπει να παρέχεται κατάλληλη επιστημονική αιτιολόγηση.

26. Τα μη επιφανειοδραστικά στερεά υποβάλλονται κατά κανόνα σε δοκιμή ως διαλύματα ή εναιωρήματα σε συγκέντρωση 20 % σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9 %, σε αποσταγμένο νερό ή σε άλλο διαλύτη για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής. Υπό ορισμένες συνθήκες και με την κατάλληλη επιστημονική αιτιολόγηση, τα στερεά μπορούν επίσης να υποβάλλονται σε δοκιμή ως έχουν, μέσω άμεσης εφαρμογής στην επιφάνεια του κερατοειδούς με τη μέθοδο του ανοικτού θαλάμου (βλ. παράγραφο 29). Οι κερατοειδείς εκτίθενται στα στερεά επί τέσσερις ώρες, αλλά, όπως και στην περίπτωση των υγρών και των επιφανειοδραστικών, μπορούν να χρησιμοποιούνται διαφορετικά διαστήματα έκθεσης κατόπιν κατάλληλης επιστημονικής αιτιολόγησης.

27. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διαφορετικές μέθοδοι αγωγής, ανάλογα με τη φύση και τα χημικά χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. στερεά, υγρά, παχύρευστα έναντι μη παχύρευστων υγρών). Παράγοντας κρίσιμης σημασίας είναι να εξασφαλίζεται ότι η ελεγχόμενη ουσία καλύπτει επαρκώς την επιφάνεια του επιθηλίου και ότι απομακρύνεται κατά την έκπλυση. Η μέθοδος κλειστού θαλάμου χρησιμοποιείται κατά κανόνα για ελεγχόμενες ουσίες μη παχύρευστες έως ελαφρώς παχύρευστες, ενώ για τις ημι-παχύρευστες και παχύρευστες, καθώς και για τα στερεά ως έχουν χρησιμοποιείται κατά κανόνα μέθοδος ανοικτού θαλάμου.

28. Στη μέθοδο κλειστού θαλάμου, ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας (750 μL) που επαρκεί ώστε να καλύπτεται το επιθήλιο του κερατοειδούς, εισάγεται στον εμπρόσθιο θάλαμο μέσω των δοσιμετρικών οπών στην επάνω επιφάνειά του και, εν συνεχεία, οι οπές σφραγίζονται κατά την έκθεση με τα πώματα του θαλάμου. Είναι σημαντικό να διασφαλίζεται η έκθεση κάθε κερατοειδούς στην ελεγχόμενη ουσία για το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα.

29. Στη μέθοδο ανοικτού θαλάμου, πριν από την αγωγή αφαιρούνται από τον εμπρόσθιο θάλαμο ο δακτύλιος ασφάλισης της θυρίδας και η γυάλινη θυρίδα. Ο μάρτυρας ή η ελεγχόμενη ουσία (750 μL ή ποσότητα που επαρκεί για την πλήρη κάλυψη του κερατοειδούς) εφαρμόζεται απευθείας στην επιφάνεια του επιθηλίου του κερατοειδούς με τη βοήθεια μικροσιφωνίου. Εάν είναι δύσκολη η αναρρόφηση μιας ελεγχόμενης ουσίας, η ουσία μπορεί να φέρεται υπό πίεση σε σιφώνιο θετικής μετατόπισης για τη διευκόλυνση της δοσιμέτρησης. Το ρύγχος του σιφωνίου θετικής μετατόπισης εισάγεται στο άκρο έκχυσης της σύριγγας κατά τρόπο ώστε το υλικό να φέρεται υπό πίεση στο ρύγχος μετατόπισης. Ταυτοχρόνως, πιέζεται το έμβολο της σύριγγας ενόσω το έμβολο του σιφωνίου έλκεται προς τα επάνω. Εάν εμφανιστούν φυσαλίδες αέρα στο ρύγχος του σιφωνίου, το δοκίμιο απομακρύνεται (εξωθείται) και η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου το ρύγχος πληρωθεί χωρίς να σχηματίζονται φυσαλίδες αέρα. Εάν χρειαστεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κανονική σύριγγα (χωρίς βελόνα), η οποία επιτρέπει τη μέτρηση επακριβούς όγκου ελεγχόμενης ουσίας και την ευκολότερη εφαρμογή στο επιθήλιο του κερατοειδούς. Μετά τη δοσιμέτρηση, η γυάλινη θυρίδα επανατοποθετείται στον εμπρόσθιο θάλαμο για να δημιουργηθεί εκ νέου κλειστό σύστημα.

▼M2

Επώαση μετά την έκθεση

30. Μετά την παρέλευση του διαστήματος έκθεσης, η ελεγχόμενη ουσία, ο αρνητικός μάρτυρας ή ο θετικός μάρτυρας απομακρύνεται από τον εμπρόσθιο θάλαμο και το επιθήλιο υποβάλλεται σε έκπλυση τουλάχιστον τρεις φορές (ή έως ότου δεν παρατηρούνται οπτικές ενδείξεις της ελεγχόμενης ουσίας) με ΕΜΕΜ (που περιέχει ερυθρό της φαινόλης). Για την έκπλυση χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό που περιέχει ερυθρό της φαινόλης διότι με την παρακολούθηση της αλλαγής του χρώματος του ερυθρού της φαινόλης είναι εφικτός ο προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας της έκπλυσης όξινων ή αλκαλικών υλικών. Οι κερατοειδείς υποβάλλονται σε έκπλυση περισσότερες από τρεις φορές, εάν το ερυθρό της φαινόλης εξακολουθεί να αποχρωματίζεται (κίτρινο ή μοβ) ή εάν παραμένει ορατή η ελεγχόμενη ουσία. Όταν η ελεγχόμενη ουσία απομακρυνθεί πλήρως από το μέσο, οι κερατοειδείς υποβάλλονται σε τελική έκπλυση με ΕΜΕΜ (χωρίς ερυθρό της φαινόλης). Το ΕΜΕΜ (χωρίς ερυθρό της φαινόλης) χρησιμοποιείται ως διάλυμα τελικής έκπλυσης ούτως ώστε να διασφαλίζεται η απομάκρυνση του ερυθρού της φαινόλης από τον εμπρόσθιο θάλαμο πριν από τη μέτρηση της αδιαφάνειας. Στη συνέχεια, ο εμπρόσθιος θάλαμος πληρώνεται εκ νέου με φρέσκο ΕΜΕΜ που δεν περιέχει ερυθρό της φαινόλης.

31. Όσον αφορά τα υγρά ή τα επιφανειοδραστικά, μετά την έκπλυσή τους οι κερατοειδείς υποβάλλονται σε επώαση για δύο επιπλέον ώρες στους 32 ± 1 °C. Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να είναι σκόπιμη η παράταση της διάρκειας επώασης μετά την έκθεση, κάτι το οποίο κρίνεται κατά περίπτωση. Οι κερατοειδείς που υποβάλλονται σε αγωγή με στερεά εκπλύνονται σχολαστικά στο τέλος του τετράωρου διαστήματος έκθεσης, αλλά δεν απαιτείται περαιτέρω επώαση.

32. Στο τέλος του διαστήματος επώασης μετά την έκθεση σε υγρά και επιφανειοδραστικά και στο τέλος του τετράωρου διαστήματος έκθεσης σε μη επιφανειοδραστικά στερεά, καταγράφεται η αδιαφάνεια και η διαπερατότητα κάθε κερατοειδούς. Επίσης, κάθε κερατοειδής επιθεωρείται οπτικά και καταγράφονται οι σχετικές παρατηρήσεις (π.χ. αποφλοίωση ιστού, κατάλοιπα ελεγχόμενης ουσίας, ανομοιογενής αδιαφάνεια). Οι παρατηρήσεις αυτές είναι πιθανότατα σημαντικές καθώς ενδέχεται να αντικατοπτρίζονται στις διακυμάνσεις των ενδείξεων του αδιαφανομέτρου.

Ουσίες-μάρτυρες

33. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονται παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες ή μάρτυρες με διαλύτη/φορέα και θετικοί μάρτυρες.

34. Κατά τη δοκιμή υγρής ουσίας χωρίς αραίωση, στη μέθοδο δοκιμών BCOP περιλαμβάνεται παράλληλος αρνητικός μάρτυρας (π.χ. χλωριούχο νάτριο 0,9 % ή αποσταγμένο νερό), ούτως ώστε να ανιχνεύονται μη ειδικές αλλαγές στο σύστημα δοκιμής και να παρέχεται μια αρχική τιμή για τα τελικά σημεία της δοκιμής. Κατά τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται επίσης ότι οι συνθήκες της δοκιμής δεν προκαλούν πλασματική απόκριση ερεθισμού.

35. Κατά τη δοκιμή αραιωμένου υγρού, επιφανειοδραστικού ή στερεού, στη μέθοδο δοκιμών BCOP περιλαμβάνεται ομάδα παράλληλου μάρτυρα με διαλύτη/φορέα, ούτως ώστε να ανιχνεύονται μη ειδικές αλλαγές στο σύστημα δοκιμής και να παρέχεται μια αρχική τιμή για τα τελικά σημεία της δοκιμασίας. Μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο διαλύτης/φορέας για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής.

36. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνεται γνωστό ερεθιστικό οφθαλμών ως παράλληλος θετικός μάρτυρας, ούτως ώστε να εξακριβώνεται η πρόκληση της κατάλληλης απόκρισης. Δεδομένου ότι στην παρούσα μέθοδο δοκιμών η δοκιμασία BCOP χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό διαβρωτικών ή ισχυρών ερεθιστικών, ο θετικός μάρτυρας πρέπει υπό ιδανικές συνθήκες να είναι ουσία αναφοράς που προκαλεί ισχυρή απόκριση στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μεθόδου δοκιμών. Προκειμένου, ωστόσο, να διασφαλισθεί η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης στον θετικό μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της απόκρισης ερεθισμού δεν πρέπει να είναι υπερβολικό.

37. Παραδείγματα θετικών μαρτύρων για τις υγρές ελεγχόμενες ουσίες είναι το διμεθυλοφορμαμίδιο ή το υδροξείδιο του νατρίου 1 %. Παράδειγμα θετικού μάρτυρα για τις στερεές ελεγχόμενες ουσίες είναι το ιμιδαζόλιο 20 % (κατά βάρος προς όγκο) σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9 %.

▼M2

38. Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται σαν σημείο αναφοράς είναι χρήσιμες για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικού ερεθισμού άγνωστων χημικών ουσιών συγκεκριμένης χημικής κατηγορίας ή κατηγορίας προϊόντων ή για την αξιολόγηση του σχετικού ερεθιστικού δυναμικού ενός ερεθιστικού των οφθαλμών εντός συγκεκριμένου εύρους αποκρίσεων ερεθισμού.

Μετρούμενα τελικά σημεία

39. Η αδιαφάνεια προσδιορίζεται από την ποσότητα φωτός που μεταδίδεται μέσω του κερατοειδούς. Η αδιαφάνεια του κερατοειδούς μετράται ποσοτικά με τη χρήση αδιαφανομέτρου, με το οποίο λαμβάνονται τιμές αδιαφάνειας μετρούμενες σε συνεχή κλίμακα.

40. Η διαπερατότητα προσδιορίζεται από την ποσότητα χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης που διαπερνά όλες τις κυτταρικές στιβάδες του κερατοειδούς (δηλ. το επιθήλιο στην εξωτερική επιφάνεια του κερατοειδούς έως το ενδοθήλιο στην εσωτερική επιφάνειά του). Στον εμπρόσθιο θάλαμο της διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς, ο οποίος βρίσκεται σε επαφή με το επιθήλιο του κερατοειδούς, προστίθεται 1 mL διαλύματος νατριούχου φλουορεσκεΐνης (4 ή 5 mg/mL κατά τη δοκιμή υγρών και επιφανειοδραστικών ή μη επιφανειοδραστικών στερεών, αντιστοίχως), ενώ ο οπίσθιος θάλαμος, που βρίσκεται σε επαφή με το ενδοθήλιο του κερατοειδούς, πληρώνεται με φρέσκο EMEM. Η διάταξη συγκράτησης επωάζεται εν συνεχεία σε οριζόντια θέση επί 90 ± 5 min σε θερμοκρασία 32 ± 1 °C. Η ποσότητα νατριούχου φλουορεσκεΐνης που εισέρχεται στον οπίσθιο θάλαμο μετράται ποσοτικά με φασματοφωτομετρία ορατού/υπεριώδους. Οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις που λαμβάνονται στα 490 nm καταγράφονται ως τιμές οπτικής πυκνότητας (OD_{490}) ή απορρόφησης, μετρούμενες σε συνεχή κλίμακα. Οι τιμές διαπερατότητας για τη φλουορεσκεΐνη προσδιορίζονται βάσει των τιμών OD_{490} που λαμβάνονται με φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός με πρότυπο μήκος διαδρομής 1 cm.

41. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων εφόσον (i) μπορεί να καθοριστεί το γραμμικό εύρος της συσκευής ανάγνωσης πλακών για τον προσδιορισμό των τιμών OD_{490} για τη φλουορεσκεΐνη και (ii) χρησιμοποιείται ο ορθός όγκος δειγμάτων φλουορεσκεΐνης στην πλάκα 96 κοιλοτήτων για την επίτευξη τιμών OD_{490} ισοδύναμων με το πρότυπο μήκος διαδρομής 1 cm (αυτό απαιτεί ενδεχομένως εντελώς πλήρεις κοιλότητες [συνήθως 360L]).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Αξιολόγηση των δεδομένων

42. Μετά τη διόρθωση των τιμών αδιαφάνειας και μέσης διαπερατότητας (OD_{490}) για να ληφθούν υπόψη η αδιαφάνεια υποβάθρου και οι τιμές διαπερατότητας OD_{490} που αντιστοιχούν στον αρνητικό μάρτυρα, οι μέσες τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας OD_{490} για κάθε ομάδα αγωγής πρέπει να συνδυάζονται σε εμπειρικό τύπο για τον υπολογισμό της βαθμολογίας ερεθιστικότητας *in vitro* (IVIS) για κάθε ομάδα αγωγής, ως εξής:

$$IVIS = \text{μέση τιμή αδιαφάνειας} + (15 \times \text{μέση τιμή διαπερατότητας } OD_{490})$$

Οι Sina *et al.* (16) αναφέρουν ότι ο συγκεκριμένος τύπος προέκυψε στο πλαίσιο ενδοεργαστηριακών και διεργαστηριακών μελετών. Τα δεδομένα που προέκυψαν για μια σειρά 36 ενώσεων στο πλαίσιο πολυεργαστηριακής μελέτης υποβλήθηκαν σε πολυμεταβλητή ανάλυση για τον καθορισμό της εξίσωσης βέλτιστης προσαρμογής δεδομένων in vivo και in vitro. Η ανάλυση αυτή διεξήχθη από επιστήμονες σε δύο διαφορετικές εταιρείες, οι οποίοι κατέληξαν σε σχεδόν πανομοιότυπες εξισώσεις.

43. Οι τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας πρέπει επίσης να αξιολογούνται χωριστά, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν μια ελεγχόμενη ουσία προκαλεί διαβρωτικότητα ή σοβαρό ερεθισμό μέσω ενός μόνο από τα δύο τελικά σημεία (βλ. κριτήρια απόφασης).

▼M2

Κριτήρια απόφασης

44. Μια ουσία που συνεπάγεται IVIS ≥ 55,1 ορίζεται ως διαβρωτική ή ισχυρά ερεθιστική. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 1, εάν η ελεγχόμενη ουσία δεν χαρακτηρίζεται ως διαβρωτική ή ισχυρά ερεθιστική για τους οφθαλμούς, πρέπει να διεξάγονται επιπρόσθετες δοκιμές για ταξινόμηση και επισήμανση. Η μέθοδος δοκιμών BCOP έχει συνολική ακρίβεια 79 % (113/143) έως 81 % (119/147), ψευδοθετικό ποσοστό 19 % (20/103) έως 21 % (22/103) και ψευδοαρνητικό ποσοστό 16 % (7/43) έως 25 % (10/40), σε σύγκριση με τα δεδομένα που προκύπτουν από τη μέθοδο οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια, τα οποία ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τα συστήματα ταξινόμησης της EPA (1), της ΕΕ (2) ή GHS (3). Όταν αποκλείονται από τη βάση δεδομένων οι ουσίες ορισμένων κατηγοριών, χημικών (αλκοόλες, κετόνες) και φυσικών (στερεά), η ακρίβεια της μεθόδου δοκιμής BCOP στα συστήματα ταξινόμησης της ΕΕ, της EPA και GHS κυμαίνεται από 87 % (72/83) έως 92 % (78/85), ενώ τα ψευδοθετικά ποσοστά κυμαίνονται από 12 % (7/58) έως 16 % (9/56) και τα ψευδοαρνητικά από 0 % (0/27) έως 12 % (3/26).

45. Ακόμη και εάν μια ελεγχόμενη ουσία δεν ταξινομηθεί ως διαβρωτική ή ισχυρά ερεθιστική για τους οφθαλμούς, τα δεδομένα της μεθόδου δοκιμής BCOP μπορούν να χρησιμεύσουν, σε συνδυασμό με δεδομένα από την οφθαλμική δοκιμή *in vivo* σε κουνέλια ή από επαρκώς επικυρωμένη δοκιμή *in vitro*, για την περαιτέρω αξιολόγηση της σκοπιμότητας και των περιορισμών της μεθόδου δοκιμών BCOP ως προς τον χαρακτηρισμό μη ισχυρών ερεθιστικών και μη ερεθιστικών (καταρτίζεται έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με τη χρήση μεθόδων δοκιμών οφθαλμικής τοξικότητας *in vitro*).

Κριτήρια αποδοχής της μελέτης

46. Μια δοκιμή θεωρείται αποδεκτή εάν για τον θετικό μάρτυρα προκύπτει IVIS που εμπίπτει εντός δύο τυπικών αποκλίσεων της ισχύουσας ιστορικής μέσης τιμής, η οποία πρέπει να επικαιροποιείται τουλάχιστον ανά τρίμηνο ή κάθε φορά που εκτελείται αποδεκτή δοκιμή σε εργαστήρια όπου δεν διεξάγονται συχνά δοκιμές (λιγότερο από μία φορά το μήνα). Οι αποκρίσεις στον αρνητικό μάρτυρα ή στον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας μικρότερες από τα καθορισμένα ανώτερα όρια των τιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας υποβάθρου για κερατοειδείς βοοειδών που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αντίστοιχο αρνητικό μάρτυρα ή μάρτυρα με διαλύτη/φορέα.

Έκθεση δοκιμής

47. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, εφόσον αυτά έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης:

Ελεγχόμενες ουσίες και μάρτυρες

χημική(ές) ονομασία(ες) όπως ο συντακτικός τύπος που χρησιμοποιείται από την υπηρεσία Chemical Abstracts Service (CAS), συνοδευόμενη(ες) από άλλες ονομασίες, εφόσον είναι γνωστές

αριθμός μητρώου CAS (RN), εάν είναι γνωστός

καθαρότητα και σύνθεση της ουσίας ή του μείγματος (σε εκατοστιαία αναλογία κατά βάρος), εφόσον τα στοιχεία αυτά είναι διαθέσιμα

φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η φυσική κατάσταση, η πτητικότητα, το pH, η σταθερότητα, η χημική κατηγορία, η υδατοδιαλυτότητα, που έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης

τυχόν επεξεργασία των ελεγχόμενων ουσιών/μαρτύρων πριν από τη δοκιμή (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση)

σταθερότητα, εφόσον είναι γνωστή.

▼M2

Πληροφορίες σχετικά με τον χορηγό και την εγκατάσταση δοκιμών

όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης

προέλευση των οφθαλμών (εγκατάσταση από την οποία συλλέχθηκαν)

συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς των οφθαλμών (π.χ. ημερομηνία και χρόνος συλλογής των οφθαλμών, χρονικό διάστημα πριν από την έναρξη της δοκιμής, μέσα μεταφοράς, συνθήκες θερμοκρασίας και τα τυχόν χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά)

εάν είναι διαθέσιμα, τα ειδικά χαρακτηριστικά των ζώων από τα οποία συλλέχθηκαν οι οφθαλμοί (π.χ. ηλικία, φύλο, βάρος του ζώου δότη).

Αιτιολόγηση της μεθόδου και του πρωτοκόλλου δοκιμής που χρησιμοποιούνται

Ακεραιότητα της μεθόδου δοκιμών

διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη διασφάλιση της ακεραιότητας (ορθότητα και αξιοπιστία) της μεθόδου δοκιμών με την πάροδο του χρόνου (π.χ. περιοδικές δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας, χρήση ιστορικών δεδομένων για τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες).

Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής

αποδεκτά πεδία τιμών για τους παράλληλους αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες βάσει ιστορικών δεδομένων

εάν υπάρχει, το αποδεκτό εύρος τιμών για τους παράλληλους μάρτυρες συγκριτικής αξιολόγησης βάσει ιστορικών δεδομένων.

Συνθήκες δοκιμής

περιγραφή του χρησιμοποιούμενου συστήματος δοκιμής

τύπος της χρησιμοποιούμενης διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς

πληροφορίες σχετικά με τη διακρίβωση των συσκευών που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της αδιαφάνειας και της διαπερατότητας (π.χ. αδιαφανόμετρο και φασματοφωτόμετρο)

πληροφορίες σχετικά με τους χρησιμοποιούμενους κερατοειδείς βοοειδών, συμπεριλαμβανομένων δηλώσεων σχετικά με την ποιότητά τους

λεπτομέρειες σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία δοκιμής

χρησιμοποιούμενη(ες) συγκέντρωση(εις) της ελεγχόμενης ουσίας

περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής

παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα του μοντέλου (π.χ. αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, ουσίες ελέγχου ικανότητας, ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης)

περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης.

Αποτελέσματα

παρουσίαση σε πίνακα των δεδομένων από μεμονωμένα δείγματα δοκιμής (π.χ. τιμές αδιαφάνειας και OD_{490} και βαθμολογία IVIS για την ελεγχόμενη ουσία δοκιμής, για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και για τους μάρτυρες συγκριτικής αξιολόγησης [εφόσον έχουν συμπεριληφθεί], σε μορφή πίνακα, καθώς και δεδομένων από πολλαπλά επαναλαμβανόμενα πειράματα ανάλογα με την περίπτωση, και μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση για κάθε πείραμα)

περιγραφή άλλων παρατηρούμενων επιδράσεων.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼M2

(2) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006. ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.

(3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007.Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). Αρ. δημοσίευσης NIH: 07-4517. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(6) ΕΚ (2006). Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ. ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://www.oecd.org/document/40/
0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.htm l]

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). Αρ. δημοσίευσης NIH: 07-4517. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

▼**M2**

(11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

(17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ακρίβεια: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μία από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών.

Ουσία που χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς: ουσία που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία που χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: (i) σταθερή(ές) και αξιόπιστη(ες) πηγή(ές), (ii) δομική και λειτουργική ομοιότητα προς την κατηγορία των ελεγχόμενων ουσιών, (iii) γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά, (iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και (v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Κερατοειδής: το διαφανές τμήμα του πρόσθιου τμήματος του οφθαλμικού βολβού το οποίο καλύπτει την ίριδα και την κόρη και επιτρέπει την είσοδο φωτός στο εσωτερικό του οφθαλμού.

Αδιαφάνεια κερατοειδούς: μέτρηση του βαθμού θολερότητας του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης σε ελεγχόμενη ουσία. Η αυξημένη αδιαφάνεια είναι ενδεικτική βλάβης του κερατοειδούς. Η αδιαφάνεια αξιολογείται υποκειμενικά, όπως στην οφθαλμική δοκιμή Draize σε κουνέλια, ή αντικειμενικά με όργανο όπως το «αδιαφανόμετρο».

Διαπερατότητα κερατοειδούς: ποσοτική μέτρηση της βλάβης στο επιθήλιο του κερατοειδούς μέσω προσδιορισμού της ποσότητας χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης που διέρχεται διαμέσου όλων των κυτταρικών στιβάδων του κερατοειδούς.

Κατηγορία EPA 1: διάβρωση (μη αναστρέψιμη καταστροφή οφθαλμικού ιστού) ή προσβολή ή ερεθισμός του κερατοειδούς που εμμένει για περισσότερες από 21 ημέρες (1).

Κατηγορία EE R41: βλάβη οφθαλμικού ιστού ή σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, κατόπιν εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν αναστρέφεται πλήρως εντός 21 ημερών από την εφαρμογή (2).

Ψευδοαρνητικό ποσοστό: το ποσοστό όλων των θετικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως αρνητικές από μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί δείκτη των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Ψευδοθετικό ποσοστό: το ποσοστό όλων των αρνητικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως θετικές από μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί δείκτη των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals/Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Προϊόντων): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένες κατηγορίες ταξινόμησης και κλίμακες φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις κινδύνου, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων, με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (3).

▼M2

Κατηγορία GHS 1: βλάβη οφθαλμικού ιστού ή σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, κατόπιν εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν αναστρέφεται πλήρως εντός 21 ημερών από την εφαρμογή (3).

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιδράσεις όταν οργανισμός, σύστημα ή (υπο)πληθυσμός εκτεθεί στον συγκεκριμένο παράγοντα.

Βαθμολογία ερεθιστικότητας *in vitro* (*In Vitro* Irritancy Score/IVIS): εμπειρικός τύπος που χρησιμοποιείται στη μέθοδο δοκιμών BCOP και στον οποίο η μέση αδιαφάνεια και η μέση διαπερατότητα για κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε αγωγή συνδυάζονται σε ενιαία βαθμολογία *in vitro* για κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε αγωγή. *IVIS* = μέση τιμή αδιαφάνειας + (15 x μέση τιμή διαπερατότητας).

Αρνητικός μάρτυρας: δείγμα-αντίγραφο- που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε αγωγή. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Μη ερεθιστικά: ουσίες που δεν ταξινομούνται ως ερεθιστικές για τους οφθαλμούς κατηγορίας EPA I, II, ή III, ούτε κατηγορίας ΕΕ R41 ή R36, ούτε κατηγορίας GHS 1, 2A ή 2B.

Διαβρωτικό των οφθαλμών: α) ουσία που προκαλεί μη αναστρέψιμη βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς, β) ουσία που ταξινομείται ως διαβρωτική για τους οφθαλμούς κατηγορίας GHS 1, EPA I ή ΕΕ R41 (1) (2) (3).

Ερεθιστικό των οφθαλμών: α) ουσία που προκαλεί αναστρέψιμη αλλαγή στους οφθαλμούς κατόπιν εφαρμογής στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, β) ουσία που ταξινομείται ως ερεθιστική για τους οφθαλμούς κατηγορίας EPA II ή III, ΕΕ R36 ή GHS 2A ή 2B (1) (2) (3).

Ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών: α) ουσία που προκαλεί βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς, κατόπιν εφαρμογής στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν υποχωρεί εντός 21 ημερών από την εφαρμογή, ή που προκαλεί σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, β) ουσία που ταξινομείται ως ερεθιστική για τους οφθαλμούς κατηγορίας GHS 1, EPA I ή ΕΕ R41 (1) (2) (3).

Αδιαφανόμετρο: όργανο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της «αδιαφάνειας του κερατοειδούς» μέσω ποσοτικής αξιολόγησης της ποσότητας του φωτός που διέρχεται από τον κερατοειδή. Το σύνηθες όργανο περιλαμβάνει δύο διαμερίσματα, το καθένα από τα οποία διαθέτει δική του φωτεινή πηγή και φωτοκύτταρο. Το ένα διαμέρισμα χρησιμοποιείται για τον κερατοειδή που έχει υποβληθεί σε αγωγή, ενώ το άλλο χρησιμοποιείται για τη διακρίβωση και τον μηδενισμό των ενδείξεων του οργάνου. Το φως από έναν λαμπτήρα αλογόνου διοχετεύεται μέσω διαμερίσματος-μάρτυρα (κενός θάλαμος χωρίς θυρίδες ούτε υγρό) σε φωτοκύτταρο και συγκρίνεται με το φως που διοχετεύεται σε φωτοκύτταρο μέσω του πειραματικού διαμερίσματος, το οποίο περικλείει τον θάλαμο που περιέχει τον κερατοειδή. Συγκρίνεται η διαφορά στη μετάδοση του φωτός από τα φωτοκύτταρα και εμφανίζεται σε ψηφιακή οθόνη μια αριθμητική τιμή αδιαφάνειας.

Θετικός μάρτυρας: δείγμα-πανομοιότυπο που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλισθεί η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης στον θετικό μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της σοβαρής απόκρισης δεν πρέπει να είναι υπερβολικό.

▼M2

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαραχθεί ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά με την πάροδο του χρόνου όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Αξιολογείται μέσω του υπολογισμού της ενδο- και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη ή του φορέα, και δεν υποβάλλεται σε αγωγή. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα της ελεγχόμενης ουσίας που έχουν υποβληθεί σε αγωγή και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, με σκοπό τον προσδιορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία διαλυμένη στον ίδιο διαλύτη ή φορέα. Όταν το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο αρνητικό μάρτυρα, υποδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης ή ο φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Κλιμακωτή δοκιμή: στρατηγική δοκιμών κατά στάδια στο πλαίσιο της οποίας όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια ελεγχόμενη ουσία εξετάζονται με συγκεκριμένη σειρά, με χρήση διαδικασίας βάρους της μαρτυρίας σε κάθε στάδιο, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο, αν για μια απόφαση ταξινόμησης κινδύνου διατίθενται επαρκείς πληροφορίες. Εάν σε ελεγχόμενη ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό ερεθιστικότητας βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών δεν είναι εφικτή η απόδοση δυναμικού ερεθιστικότητας σε ελεγχόμενη ουσία, εφαρμόζεται κλιμακωτή διαδικασία διαδοχικών ελέγχων σε ζώα έως ότου καταστεί εφικτή η βέβαιη ταξινόμηση της ουσίας.

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ορθότητα και η αξιοπιστία μιας επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών ενδέχεται να μην επαρκούν για την αποδοχή της για τον προτεινόμενο σκοπό.

Βάρος της απόδειξης: η διαδικασία εξέτασης των πλεονεκτημάτων και των αδυναμιών διαφόρων πληροφοριών για τη συναγωγή και την τεκμηρίωση συμπεράσματος σχετικά με την επικινδυνότητα μιας ουσίας.

▼M2

Προσάρτημα 2

Ουσίες ελέγχου ικανότητας για τη μέθοδο δοκιμών BCOP

Πριν από την ένταξη μιας μεθόδου που συμφωνεί με την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην καθημερινή πρακτική, τα εργαστήρια ενδέχεται να επιθυμούν να αποδείξουν την τεχνική τους ικανότητα προσδιορίζοντας ορθά την ταξινόμηση της διαβρωτικότητας των 10 συνιστώμενων στον πίνακα 1 ουσιών για τους οφθαλμούς. Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων για τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση των οφθαλμών, το οποίο βασίζεται στα αποτελέσματα της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια (TG 405) (κατηγορίες 1, 2A, 2B ή χωρίς ταξινόμηση και επισήμανση σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (3) (7)). Λαμβανομένης, ωστόσο, υπόψη της επικυρωμένης σκοπιμότητας των δοκιμασιών αυτών (δηλ. μόνο για τον χαρακτηρισμό διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών), η ικανότητα αποδεικνύεται μόνο με δύο αποτελέσματα δοκιμών για ταξινόμηση (διαβρωτικό/ισχυρό ερεθιστικό ή μη διαβρωτικό/μη ισχυρό ερεθιστικό). Άλλα κριτήρια επιλογής αφορούσαν τη διαθεσιμότητα των ουσιών στο εμπόριο και την ύπαρξη υψηλής ποιότητας δεδομένων αναφοράς *in vivo*, καθώς και δεδομένων υψηλής ποιότητας από τις δύο μεθόδους *in vitro* για τις οποίες καταρτίζονται κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών. Για τον λόγο αυτό, οι ερεθιστικές ουσίες επιλέχθηκαν από τον συνιστώμενο από την ICCVAM κατάλογο 122 ουσιών αναφοράς για την επικύρωση μεθόδων δοκιμών οφθαλμικής τοξικότητας *in vitro* (βλ. Appendix H: ICCVAM Recommended Reference Substances/Προσάρτημα H: Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς της ICCVAM) (5). Τα δεδομένα αναφοράς διατίθενται στα Background Review Documents (έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων) της ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών BCOP και τη μέθοδο δοκιμών σε απομονωμένους οφθαλμούς ορνιθίων (ICE) (17) (18).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη της τεχνικής ικανότητας ως προς τη δοκιμή BCOP

Χημική ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία ([1])	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση *In Vivo* ([2])	Ταξινόμηση *In Vitro* ([3])
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (5%)	8001-54-5	Κατιονική ένωση	Υγρό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Χλωρεξιδίνη	55-56-1	Αμίνη, αμιδίνη	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
L-τρυγικό διβενζοΰλιο	2743-38-6	Εστέρας καρβοξυλικού οξέος	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Ιμιδαζόλιο	288-32-4	Ετεροκυκλική ένωση	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Τριχλωροξικό οξύ (30%)	76-03-9	Καρβοξυλικό οξύ	Υγρό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
2,6-διχλωροβενζοϋλοχλωρίδιο	4659-45-4	Ακυλαλογονίδιο	Υγρό	Κατηγορία 2A	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
2-μεθυλακετοξικό αιθύλιο	609-14-3	Κετονεστέρας	Υγρό	Κατηγορία 2B	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
Νιτρικό αμμώνιο	6484-52-2	Ανόργανο άλας	Στερεό	Κατηγορία 2A	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό

▼**M2**

Χημική ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία (1)	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση *In Vivo* (2)	Ταξινόμηση *In Vitro* (3)
Γλυκερίνη	56-81-5	Αλκοόλη	Υγρό	Χωρίς επισήμανση	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
n-εξάνιο	110-54-3	Υδρογονάνθρακας (άκυκλος)	Υγρό	Χωρίς επισήμανση	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό

Συντμήσεις: CASRN = Αριθμός Μητρώου της Chemical Abstracts Service

(1) Κάθε ελεγχόμενη ουσία δοκιμής κατατάχθηκε σε χημική κατηγορία σύμφωνα με τυποποιημένο σύστημα ταξινόμησης, βάσει του συστήματος ταξινόμησης Medical Subject Headings (MeSH) της National Library of Medicine (θεματικές επικεφαλίδες ιατρικού περιεχομένου της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης, διατίθεται στον δικτυακό τόπο http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Βάσει των αποτελεσμάτων της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια (OECD TG 405) και σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (3)(7).

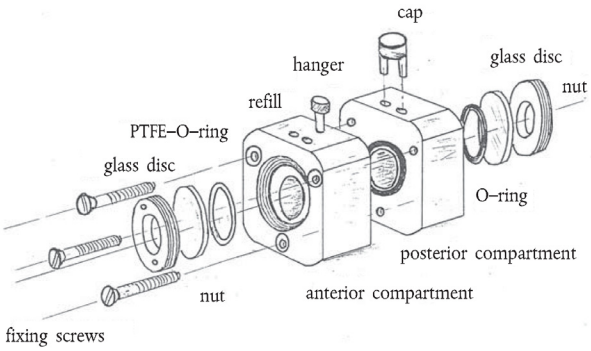
(3) Βάσει των αποτελεσμάτων των μεθόδων δοκιμών BCOP και ICE.

▼**M2**

Προσάρτημα 3

ΔΙΑΤΑΞΗ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ BCOP

1. Οι διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς στο πλαίσιο της μεθόδου δοκιμών BCOP κατασκευάζονται από αδρανές υλικό (π.χ. πολυπροπυλένιο). Οι διατάξεις αποτελούνται από δύο ημίσεα (εμπρόσθιο και οπίσθιο θάλαμο) και έχουν δύο παρόμοιους εσωτερικούς κυλινδρικούς θαλάμους. Κάθε θάλαμος έχει χωρητικότητα 5 mL και καταλήγει σε γυάλινη θυρίδα, μέσω της οποίας καταγράφονται οι μετρήσεις αδιαφάνειας. Καθένας από τους εσωτερικούς θαλάμους έχει διάμετρο 1,7 cm και βάθος 2,2 cm ([1]). Για την αποφυγή διαρροών χρησιμοποιείται στεγανοποιητικός δακτύλιος που βρίσκεται στον οπίσθιο θάλαμο. Ο κερατοειδής τοποθετείται με την πλευρά του ενδοθηλίου προς τα κάτω, επάνω στον στεγανοποιητικό δακτύλιο του οπισθίου θαλάμου και ο εμπρόσθιος θάλαμος τοποθετείται στην πλευρά του επιθηλίου του κερατοειδούς. Οι θάλαμοι συγκρατούνται στη θέση τους με τρεις ανοξείδωτους χαλύβδινους κοχλίες που βρίσκονται στα εξωτερικά άκρα κάθε θαλάμου. Κάθε θάλαμος καταλήγει σε γυάλινη θυρίδα που μπορεί να αποσπάται για εύκολη πρόσβαση στον κερατοειδή. Μεταξύ της γυάλινης θυρίδας και του θαλάμου παρεμβάλλεται επίσης στεγανοποιητικός δακτύλιος για την αποφυγή διαρροών. Δύο οπές στο άνω τμήμα κάθε θαλάμου καθιστούν εφικτή την προσθήκη και αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ενώσεων δοκιμής. Οι οπές αυτές κλείνουν κατά τη διάρκεια της αγωγής και της επώασης με πώματα από καουτσούκ.



Υπόμνημα

Glass disc: Γυάλινος δίσκος

PTFE-O-ring: Στεγανοποιητικός δακτύλιος από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE)

Refill: Αναπλήρωση

Hanger: Αναρτήρας

Cap: Πώμα

Nut: Περικόχλιο

O-ring: Στεγανοποιητικός δακτύλιος

Posterior compartment: Οπίσθιο διαμέρισμα

Anterior compartment: Εμπρόσθιο διαμέρισμα

Fixing screws: Κοχλίες στερέωσης

([1]) Οι αναφερόμενες διαστάσεις βασίζονται σε διάταξη συγκράτησης κερατοειδούς που χρησιμοποιείται για αγελάδες ηλικίας 12 έως 60 μηνών. Εάν χρησιμοποιούνται ζώα ηλικίας 6 έως 12 μηνών, η διάταξη συγκράτησης πρέπει να είναι σχεδιασμένη κατά τρόπο ώστε κάθε θάλαμος να έχει χωρητικότητα 4 mL και κάθε εσωτερικός θάλαμος να έχει διάμετρο 1,5 cm και βάθος 2,2 cm. Σε κάθε διάταξη συγκράτησης νέας κατασκευής είναι πολύ σημαντικό η αναλογία της εκτεθειμένης επιφάνειας κερατοειδούς προς τη χωρητικότητα του οπίσθιου θαλάμου να είναι η ίδια όπως στη συμβατική διάταξη συγκράτησης κερατοειδούς. Αυτό είναι απαραίτητο ούτως ώστε να διασφαλίζεται ο ορθός προσδιορισμός των τιμών διαπερατότητας για τον υπολογισμό της IVIS με τη βοήθεια του προτεινόμενου τύπου.

▼**M2**

ΤΟ ΑΔΙΑΦΑΝΟΜΕΤΡΟ

2. Το αδιαφανόμετρο είναι διάταξη μέτρησης της μετάδοσης του φωτός. Το φως από έναν λαμπτήρα αλογόνου διοχετεύεται μέσω διαμερίσματος-μάρτυρα (κενός θάλαμος χωρίς θυρίδες ούτε υγρό) σε φωτοκύτταρο και συγκρίνεται με το φως που διοχετεύεται σε φωτοκύτταρο μέσω του πειραματικού διαμερίσματος το οποίο περικλείει τον θάλαμο που περιέχει τον κερατοειδή. Συγκρίνεται η διαφορά στη μετάδοση του φωτός από τα φωτοκύτταρα και εμφανίζεται σε ψηφιακή οθόνη μια αριθμητική τιμή αδιαφάνειας, εκφραζόμενη σε μονάδες αδιαφάνειας.

3. Το αδιαφανόμετρο πρέπει να παρέχει γραμμική απόκριση σε ένα εύρος ενδείξεων αδιαφάνειας το οποίο καλύπτει τις τιμές διαχωρισμού (cut-off) που χρησιμοποιούνται για τις διάφορες ταξινομήσεις που περιγράφονται στο μοντέλο πρόβλεψης (έως και την τιμή διαχωρισμού που καθορίζει τη διαβρωτικότητα/ισχυρή ερεθιστικότητα). Για να διασφαλίζονται η γραμμικότητα και η ορθότητα των ενδείξεων έως και τις 75-80 μονάδες αδιαφάνειας, είναι απαραίτητη η διακρίβωση του αδιαφανομέτρου με σειρά βαθμονομητών. Οι βαθμονομητές (αδιαφανή πολυεστερικά φύλλα) τοποθετούνται στον θάλαμο διακρίβωσης (θάλαμος της διάταξης συγκράτησης του κερατοειδούς όπου τοποθετούνται οι βαθμονομητές) και παρέχουν ενδείξεις που εμφανίζονται στο αδιαφανόμετρο. Ο θάλαμος διακρίβωσης είναι κατασκευασμένος έτσι ώστε να συγκρατεί τους βαθμονομητές στην ίδια περίπου απόσταση μεταξύ του λαμπτήρα και του φωτοκυττάρου στην οποία τοποθετούνται οι κερατοειδείς κατά τη διάρκεια των μετρήσεων αδιαφάνειας. Το αδιαφανόμετρο διακριβώνεται αρχικά στις 0 μονάδες αδιαφάνειας χωρίς βαθμονομητή στον θάλαμο διακρίβωσης. Εν συνεχεία, στον θάλαμο διακρίβωσης τοποθετούνται διαδοχικά τρεις βαθμονομητές και μετρώνται οι τιμές αδιαφάνειας. Από τους βαθμονομητές 1, 2 και 3 πρέπει να προκύπτουν ενδείξεις αδιαφάνειας ίσες με τις καθορισμένες τιμές 75, 150 και 225 μονάδων αδιαφάνειας, αντιστοίχως, με απόκλιση ± 5 %.

▼M2

Β. 48 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥΣ ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΣΧΥΡΩΝ ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η μέθοδος δοκιμών σε απομονωμένους οφθαλμούς ορνιθίων (Isolated Chicken Eye/ICE) αποτελεί μέθοδο δοκιμών *in vitro* που μπορεί να χρησιμοποιείται, υπό συγκεκριμένες περιστάσεις και περιορισμούς, για την ταξινόμηση ουσιών και μειγμάτων ως διαβρωτικών και ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών (1) (2) (3). Για τους σκοπούς της παρούσας κατευθυντήριας γραμμής δοκιμής, ως ισχυρά ερεθιστικά ορίζονται εκείνα που προκαλούν οφθαλμικές αλλοιώσεις που εμμένουν στο κουνέλι για τουλάχιστον 21 ημέρες μετά τη χορήγηση. Αν και δεν θεωρείται έγκυρη για την πλήρη αντικατάσταση της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια, η μέθοδος ICE συνιστάται για χρήση στο πλαίσιο στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών για ρυθμιστική ταξινόμηση και επισήμανση εντός συγκεκριμένου πεδίου εφαρμογής (4) (5). Οι ελεγχόμενες ουσίες και μείγματα (6) που εμφανίζουν θετικά αποτελέσματα στην παρούσα δοκιμασία μπορούν να ταξινομηθούν ως διαβρωτικά ή ισχυρά ερεθιστικά των οφθαλμών χωρίς περαιτέρω δοκιμές σε κουνέλια. Ουσίες που εμφανίζουν αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή σε κουνέλια στο πλαίσιο στρατηγικής διαδοχικών ελέγχων, όπως περιγράφεται στην κατευθυντήρια γραμμή 405 (7) του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (κεφάλαιο Β. 5 του παρόντος παραρτήματος).

2. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η περιγραφή των διαδικασιών που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της πιθανής διαβρωτικότητας ή ισχυρής ερεθιστικότητας μιας ελεγχόμενης ουσίας για τους οφθαλμούς, όπως μετράται από την ικανότητά της να προκαλεί τοξικότητα σε εξορυγμένο οφθαλμό ορνιθίου. Οι τοξικές επιδράσεις στον κερατοειδή μετρώνται με: (i) ποιοτική αξιολόγηση της αδιαφάνειας, (ii) ποιοτική αξιολόγηση της βλάβης στο επιθήλιο βάσει της εφαρμογής φλουορεσκεΐνης στον οφθαλμό (κατακράτηση φλουορεσκεΐνης), (iii) ποσοτική μέτρηση της αύξησης του πάχους (οίδημα) και (iv) ποιοτική αξιολόγηση της μακροσκοπικής μορφολογικής βλάβης στην επιφάνεια. Οι αξιολογήσεις της αδιαφάνειας, του οιδήματος και της βλάβης του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία πραγματοποιούνται χωριστά και εν συνεχεία συνδυάζονται για την ταξινόμηση της οφθαλμικής ερεθιστικότητας.

3. Σε δοκιμές με τη μέθοδο ICE έχουν υποβληθεί και ερεθιστικά των οφθαλμών που προκαλούν αλλοιώσεις οι οποίες υποχωρούν εντός διαστήματος μικρότερου των 21 ημερών, καθώς και μη ερεθιστικά. Εντούτοις, δεν έχουν αξιολογηθεί επισήμως η ορθότητα και η αξιοπιστία της μεθόδου δοκιμών ICE για ουσίες που εμπίπτουν σε αυτές τις κατηγορίες.

4. Στο προσάρτημα 1 παρέχονται ορισμοί.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στο πρωτόκολλο της μεθόδου δοκιμών ICE της Διυπηρεσιακής Συντονιστικής Επιτροπής για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ICCVAM) (8), το οποίο καταρτίστηκε βάσει διεθνούς μελέτης επικύρωσης (4) (5) (9), με τη συνεισφορά του Ευρωπαϊκού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM), του Ιαπωνικού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM) και του Τμήματος Τοξικολογίας και Εφαρμοσμένης Φαρμακολογίας του θεματικού τομέα «Ποιότητα ζωής» (Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology) του ερευνητικού οργανισμού TNO (Κάτω Χώρες). Το πρωτόκολλο βασίζεται σε στοιχεία που ελήφθησαν από δημοσιευμένα πρωτόκολλα, καθώς και στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται επί του παρόντος από τον οργανισμό TNO (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. Οι περιορισμοί που προσδιορίστηκαν για την παρούσα μέθοδο βασίζονται στο ψευδοθετικό ποσοστό για τις αλκοόλες και στα ψευδοαρνητικά ποσοστά για τα στερεά και τα επιφανειοδραστικά (βλ. παράγραφο 47) (4). Όταν αποκλείονται από τη βάση δεδομένων οι ουσίες που εμπίπτουν σε αυτές τις χημικές και φυσικές κατηγορίες, αυξάνεται σημαντικά η ορθότητα της ICE στα συστήματα ταξινόμησης της ΕΕ, της EPA (Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ) και GHS (Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων) (4). Για τον σκοπό της παρούσας δοκιμασίας (δηλ. την ταυτοποίηση μόνο των διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών), τα ψευδοαρνητικά ποσοστά δεν είναι κρίσιμης σημασίας, διότι οι ουσίες αυτές θα υποβληθούν ακολούθως σε δοκιμή σε κουνέλια ή σε άλλες επαρκώς επικυρωμένες δοκιμές *in vitro*, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις, στο πλαίσιο στρατηγικής διαδοχικών ελέγχων με μέθοδο προσέγγισης βασιζόμενη στο βάρος της απόδειξης. Επιπλέον, η υφιστάμενη βάση δεδομένων επικύρωσης δεν καθιστά εφικτή τη δέουσα αξιολόγηση ορισμένων χημικών κατηγοριών ή κατηγοριών προϊόντων (π.χ. των μειγμάτων). Παρόλα αυτά, οι ερευνητές θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν την παρούσα μέθοδο δοκιμών για όλους τους τύπους ελεγχόμενων υλικών (συμπεριλαμβανομένων των μειγμάτων), με τα θετικά αποτελέσματα να θεωρούνται ενδεικτικά απόκρισης των οφθαλμών για διαβρωτικό ή ισχυρό ερεθιστικό. Πάντως, τα θετικά αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις αλκοόλες πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή λόγω κινδύνου υπερεκτιμημένης πρόβλεψης.

7. Όλες οι διαδικασίες με τους οφθαλμούς ορνιθίων πρέπει να συμμορφώνονται προς τους κανονισμούς και τις διαδικασίες που εφαρμόζονται στην εγκατάσταση δοκιμών για τον χειρισμό υλικών ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, των ιστών και ιστικών υγρών. Συνιστάται η τήρηση των γενικών εργαστηριακών προφυλάξεων (15).

8. Ένας περιορισμός της μεθόδου δοκιμής συνίσταται στο ότι, αν και λαμβάνει υπόψη ορισμένες από τις επιδράσεις στους οφθαλμούς οι οποίες αξιολογήθηκαν στη μέθοδο δοκιμών οφθαλμικής ερεθιστικότητας σε κουνέλια και, εν μέρει, τη σοβαρότητά τους, δεν λαμβάνει υπόψη τους τραυματισμούς του επιπεφυκότος και της ίριδας. Επίσης, μολονότι δεν είναι εφικτή η αξιολόγηση αυτής καθαυτής της αναστρεψιμότητας των βλαβών του κερατοειδούς στο πλαίσιο της μεθόδου δοκιμών ICE, έχει προταθεί, βάσει των οφθαλμικών μελετών σε κουνέλια, η αξιολόγηση του αρχικού βάθους του τραύματος του κερατοειδούς για τη διάκριση μεταξύ μη αναστρέψιμων και αναστρέψιμων επιδράσεων (16). Τέλος, η μέθοδος δοκιμών ICE δεν καθιστά εφικτή την αξιολόγηση του δυναμικού συστημικής τοξικότητας που συνδέεται με την έκθεση των οφθαλμών.

9. Συνεχίζονται οι προσπάθειες για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της σκοπιμότητας και των περιορισμών της μεθόδου δοκιμών ICE ως προς τον χαρακτηρισμό των μη ισχυρών ερεθιστικών και των μη ερεθιστικών (βλ. επίσης παράγραφο 48). Συνιστάται επίσης στους χρήστες να παρέχουν δείγματα ή/και δεδομένα σε φορείς επικύρωσης για μια επίσημη αξιολόγηση των πιθανών μελλοντικών χρήσεων της μεθόδου δοκιμών ICE, καθώς και για τον χαρακτηρισμό των μη ισχυρών ερεθιστικών και των μη ερεθιστικών.

10. Τα εργαστήρια που διεξάγουν για πρώτη φορά την παρούσα δοκιμή πρέπει να χρησιμοποιούν τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας που προβλέπονται στο προσάρτημα 2. Ένα εργαστήριο μπορεί να χρησιμοποιεί αυτές τις χημικές ουσίες για να αποδείξει την τεχνική ικανότητά του όσον αφορά την εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών ICE, πριν από την υποβολή δεδομένων από τη δοκιμή ICE, για κανονιστική ταξινόμηση κινδύνων.

ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

11. Η μέθοδος δοκιμών ICE είναι ένα οργανοτυπικό μοντέλο που εξασφαλίζει βραχυπρόθεσμη διατήρηση των οφθαλμών ορνιθίων *in vitro*. Στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών, η βλάβη που προκαλείται από την ελεγχόμενη ουσία αξιολογείται μέσω προσδιορισμού του οιδήματος και της αδιαφάνειας του κερατοειδούς και της κατακράτησης φλουορεσκεΐνης. Με τις δύο τελευταίες παραμέτρους επιτυγχάνεται ποιοτική αξιολόγηση, ενώ η ανάλυση του οιδήματος του κερατοειδούς παρέχει ποσοτική αξιολόγηση. Κάθε μέτρηση είτε μετατρέπεται σε ποσοτική βαθμολογία για τον υπολογισμό ενός συνολικού δείκτη ερεθισμού είτε κατατάσσεται σε ποιοτική κατηγορία, η οποία χρησιμοποιείται για ταξινόμηση ως προς την οφθαλμική διαβρωτικότητα και την ισχυρή ερεθιστικότητα *in* vitro. Το καθένα από αυτά τα αποτελέσματα μπορεί εν συνεχεία να χρησιμοποιείται για την πρόγνωση του δυναμικού οφθαλμικής διαβρωτικότητας και ισχυρής ερεθιστικότητας *in vivo* μιας ελεγχόμενης ουσίας (βλ. κριτήρια απόφασης).

▼M2

Προέλευση και ηλικία των οφθαλμών των ορνιθίων

12. Έχει παγιωθεί ιστορικά η χρήση, για τη δοκιμή, οφθαλμών που συλλέγονται από ορνίθια που θανατώνονται σε σφαγείο για κατανάλωση από τον άνθρωπο, γεγονός που συνεπάγεται ότι δεν απαιτείται η χρήση πειραματόζωων. Χρησιμοποιούνται μόνο οφθαλμοί υγιών ζώων που θεωρούνται κατάλληλα για είσοδο στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα.

13. Αν και δεν έχει διενεργηθεί ελεγχόμενη μελέτη για την αξιολόγηση της βέλτιστης ηλικίας των ορνιθίων, στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμής χρησιμοποιούνται κατά παράδοση τα νεαρά ορνίθια που οδηγούνται συνήθως σε σφαγείο πουλερικών (ηλικίας περίπου 7 εβδομάδων και βάρους 1,5 – 2,5 kg).

Συλλογή και μεταφορά των οφθαλμών στο εργαστήριο

14. Τα κεφάλια πρέπει να αφαιρούνται αμέσως μετά την αναισθητοποίηση των ορνιθίων, συνήθως με ηλεκτροπληξία, και την τομή στον τράχηλο για αφαίμαξη. Η εγκατάσταση από την οποία προέρχονται τα ορνίθια πρέπει να βρίσκεται κοντά στο εργαστήριο ούτως ώστε τα κεφάλια να μεταφέρονται ταχέως από το σφαγείο στο εργαστήριο προκειμένου να ελαχιστοποιείται η υποβάθμιση ή/και η βακτηριδιακή μόλυνση. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της συλλογής των κεφαλών των ορνιθίων και της χρήσης των οφθαλμών στη μέθοδο δοκιμών ICE πρέπει να είναι το μικρότερο δυνατόν (κατά κανόνα εντός δύο ωρών) και να αποδεικνύεται ότι δεν υπονομεύει τα αποτέλεσμα της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα αυτά βασίζονται στα κριτήρια επιλογής των οφθαλμών, καθώς και στις αποκρίσεις των θετικών και των αρνητικών μαρτύρων. Όλοι οι οφθαλμοί που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία πρέπει να προέρχονται από την ίδια ομάδα οφθαλμών που συλλέχθηκαν συγκεκριμένη ημέρα.

15. Επειδή οι οφθαλμοί ανατέμνονται στο εργαστήριο, οι κεφαλές μεταφέρονται από το σφαγείο ολόκληρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, εντός πλαστικών δοχείων που διατηρούνται υγρά με πετσέτες εμποτισμένες με ισότονο αλατούχο διάλυμα (φυσιολογικό ορό).

Κριτήρια επιλογής για τους οφθαλμούς που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο ICE

16. Οφθαλμοί με υψηλή αρχική χρώση φλουορεσκεΐνης (> 0,5) ή βαθμολογία αδιαφάνειας κερατοειδούς > 0,5 μετά την εξόρυξή τους, απορρίπτονται.

17. Κάθε ομάδα αγωγής και κάθε ομάδα παράλληλων θετικών μαρτύρων αποτελείται από τρεις τουλάχιστον οφθαλμούς. Η ομάδα αρνητικών μαρτύρων ή μαρτύρων με διαλύτη (εάν δεν χρησιμοποιείται φυσιολογικός ορός ως διαλύτης) αποτελείται από τουλάχιστον έναν οφθαλμό.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Προετοιμασία των οφθαλμών

18. Τα βλέφαρα εκτέμνονται προσεκτικά κατά τρόπο ώστε να μην προκαλείται βλάβη στον κερατοειδή. Η ακεραιότητα του κερατοειδούς αξιολογείται ταχέως με την ενστάλαξη σταγόνας νατριούχου φλουορεσκεΐνης 2 % w/v στην επιφάνεια του κερατοειδούς για λίγα δευτερόλεπτα. Ακολουθεί έκπλυση του κερατοειδούς με ισότονο φυσιολογικό ορό. Οι οφθαλμοί που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με φλουορεσκεΐνη εξετάζονται με σχισμοειδή λυχνία για να διαπιστώνεται αν είναι άθικτος ο κερατοειδής (κατακράτηση φλουορεσκεΐνης και αδιαφάνεια κερατοειδούς ≤ 0,5).

19. Εάν ο κερατοειδής είναι άθικτος, ο οφθαλμός εκτέμνεται περαιτέρω από το κρανίο με προσοχή, κατά τρόπο ώστε να μην προκαλείται βλάβη στον κερατοειδή. Ο βολβός αποσπάται από τον οφθαλμικό κόγχο με χειρουργικές λαβίδες, με τις οποίες συγκρατείται σταθερά η σκληρά μήνιγγα, ενώ αποκόπτονται οι οφθαλμικοί μυς με κυρτό αμβλύ ψαλίδι. Είναι σημαντικό να αποφεύγεται η άσκηση υπερβολικής πίεσης ώστε να μην προκαλείται βλάβη στον κερατοειδή (τεχνητά σφάλματα λόγω συμπίεσης).

20. Κατά την απόσπαση του οφθαλμού από τον οφθαλμικό κόγχο πρέπει να παραμένει συνδεδεμένο ένα ορατό τμήμα του οπτικού νεύρου. Μετά την αφαίρεσή του από τον οφθαλμικό κόγχο, ο οφθαλμός τοποθετείται σε απορροφητικό τολύπιο και αφαιρούνται η σκληρά μήνιγγα και ο λοιπός συνδετικός ιστός.

▼M2

21. Ο εξορυγμένος οφθαλμός στερεώνεται σε σφιγκτήρα από ανοξείδωτο χάλυβα με τον κερατοειδή σε κατακόρυφη θέση. Ο σφιγκτήρας μεταφέρεται εν συνεχεία σε θάλαμο της συσκευής υπέρτηξης (16). Οι σφιγκτήρες πρέπει να τοποθετούνται στη συσκευή υπέρτηξης κατά τρόπο ώστε ολόκληρος ο κερατοειδής να καλύπτεται με τον ισότονο φυσιολογικό ορό. Η θερμοκρασία των θαλάμων της συσκευής υπέρτηξης πρέπει να είναι ελεγχόμενη στους 32 ± 1,5 °C. Στο προσάρτημα 3 παρατίθεται διάγραμμα τυπικής συσκευής υπέρτηξης και των σφιγκτήρων οφθαλμών, που κυκλοφορούν στο εμπόριο ή κατασκευάζονται κατά παραγγελία. Η συσκευή μπορεί να τροποποιείται ούτως ώστε να προσαρμόζεται στις ανάγκες του εκάστοτε εργαστηρίου (π.χ. να χωράει διαφορετικό αριθμό οφθαλμών).

22. Μετά την τοποθέτησή τους στη συσκευή υπέρτηξης, οι οφθαλμοί επανεξετάζονται με μικροσκόπιο με σχισμοειδή λυχνία ούτως ώστε να διαπιστωθεί ότι δεν υπέστησαν βλάβη κατά τη διαδικασία ανατομής. Παράλληλα, πρέπει να μετράται το πάχος του κερατοειδούς στην κορυφή του με το παχύμετρο της σχισμοειδούς λυχνίας. Οι οφθαλμοί με (i) κατακράτηση φλουορεσκεΐνης > 0,5, (ii) αδιαφάνεια κερατοειδούς > 0,5 ή (iii) περαιτέρω ενδείξεις βλάβης πρέπει να αντικαθίστανται. Από τους οφθαλμούς που δεν απορρίπτονται βάσει οποιουδήποτε από τα προαναφερθέντα κριτήρια, οι μεμονωμένοι οφθαλμοί με πάχος κερατοειδούς που αποκλίνει κατά περισσότερο από 10 % από τη μέση τιμή για το σύνολο των οφθαλμών, πρέπει να απορρίπτονται. Οι χρήστες πρέπει να γνωρίζουν ότι από μικροσκόπια με σχισμοειδείς λυχνίες ενδέχεται να προκύψουν διαφορετικές μετρήσεις του πάχους του κερατοειδούς ανάλογα με το πλάτος της σχισμής. Το πλάτος της σχισμής πρέπει να ρυθμίζεται στα 0,095 mm.

23. Όταν όλοι οι οφθαλμοί έχουν εξετασθεί και εγκριθεί, επωάζονται επί περίπου 45 έως 60 λεπτά για την εξισορρόπησή τους με το σύστημα δοκιμής πριν από τη δοσιμέτρηση. Μετά την παρέλευση του διαστήματος εξισορρόπησης, καταγράφεται η μηδενική μέτρηση αναφοράς ως αρχική τιμή του πάχους και της αδιαφάνειας του κερατοειδούς (χρόνος = 0). Η βαθμολογία κατακράτησης φλουορεσκεΐνης κατά την ανατομή χρησιμοποιείται ως η αρχική μέτρηση για το συγκεκριμένο τελικό σημείο.

Εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας

24. Αμέσως μετά τις μηδενικές μετρήσεις αναφοράς, ο οφθαλμός (στον σφιγκτήρα του) απομακρύνεται από τη συσκευή υπέρτηξης, τοποθετείται σε οριζόντια θέση και στον κερατοειδή εφαρμόζεται η ελεγχόμενη ουσία.

25. Οι υγρές ελεγχόμενες ουσίες υποβάλλονται κατά κανόνα σε δοκιμή χωρίς να αραιώνονται, αλλά μπορούν να αραιώνονται εάν κριθεί απαραίτητο (π.χ. στο πλαίσιο του σχεδιασμού της μελέτης). Ο προτιμώμενος διαλύτης για την αραίωση των ουσιών είναι ο φυσιολογικός ορός. Μπορούν όμως να χρησιμοποιούνται και εναλλακτικοί διαλύτες υπό ελεγχόμενες συνθήκες, αλλά πρέπει να αποδεικνύεται η καταλληλότητά τους.

26. Οι υγρές ελεγχόμενες ουσίες εφαρμόζονται στον κερατοειδή κατά τρόπο ώστε ολόκληρη η επιφάνειά του να καλύπτεται ομοιογενώς με την ελεγχόμενη ουσία. Ο τυπικός όγκος είναι 0,03 mL.

27. Εάν είναι εφικτό, οι στερεές ουσίες πρέπει να κονιοποιούνται σε όσο το δυνατόν λεπτότερους κόκκους σε ιγδίο με ύπερο, ή με συγκρίσιμο εργαλείο λειοτρίβησης. Η σκόνη εφαρμόζεται στον κερατοειδή κατά τρόπο ώστε η επιφάνειά του να καλύπτεται ομοιόμορφα με την ελεγχόμενη ουσία. Η τυπική ποσότητα είναι 0,03 g.

28. Η ελεγχόμενη ουσία (υγρή ή στερεά) εφαρμόζεται επί 10 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια εκπλύνεται από τον οφθαλμό με ισότονο φυσιολογικό ορό (περίπου 20 mL) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθως, ο οφθαλμός (στον σφιγκτήρα του) επαναφέρεται στη συσκευή υπέρτηξης στην αρχική κατακόρυφη θέση.

Ουσίες-μάρτυρες

29. Κάθε πείραμα πρέπει να περιλαμβάνει παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες ή μάρτυρες με διαλύτη/φορέα και θετικούς μάρτυρες.

▼M2

30. Κατά τη δοκιμή υγρών χωρίς αραίωση ή στερεών, ως παράλληλος αρνητικός μάρτυρας στη μέθοδο δοκιμών ICE χρησιμοποιείται φυσιολογικός ορός για την ανίχνευση μη ειδικών αλλαγών στο σύστημα δοκιμής και για να εξασφαλίζεται ότι οι συνθήκες δοκιμασίας δεν προκαλούν πλασματική απόκριση ερεθισμού.

31. Κατά τη δοκιμή αραιωμένων υγρών, στη μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνεται ομάδα παράλληλων μαρτύρων με διαλύτη/φορέα για την ανίχνευση μη ειδικών αλλαγών στο σύστημα δοκιμής και για να εξασφαλίζεται ότι οι συνθήκες δοκιμής δεν προκαλούν πλασματική απόκριση ερεθισμού. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 25, μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο διαλύτης/φορέας για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής.

32. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνεται γνωστό ερεθιστικό των οφθαλμών ως παράλληλος θετικός μάρτυρας ούτως ώστε να επιβεβαιώνεται η πρόκληση της κατάλληλης απόκρισης. Δεδομένου ότι στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών η δοκιμασία ICE χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό διαβρωτικών ή ισχυρών ερεθιστικών, ο θετικός μάρτυρας πρέπει να είναι ουσία αναφοράς που προκαλεί σοβαρή απόκριση στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μεθόδου. Ωστόσο, για να διασφαλισθεί η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης στον θετικό μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της σοβαρής απόκρισης δεν πρέπει να είναι υπερβολικό. Πρέπει να παράγονται επαρκή δεδομένα *in vitro* για τον θετικό μάρτυρα ούτως ώστε να είναι εφικτός ο υπολογισμός ενός στατιστικώς καθορισμένου αποδεκτού εύρους του θετικού μάρτυρα. Εάν για έναν συγκεκριμένο θετικό μάρτυρα δεν διατίθενται επαρκή ιστορικά δεδομένα από τη μέθοδο δοκιμών ICE, ενδέχεται να απαιτείται η διεξαγωγή μελετών για την απόκτηση αυτών των πληροφοριών.

33. Παραδείγματα θετικών μαρτύρων για υγρές ελεγχόμενες ουσίες είναι το οξικό οξύ 10 % ή το χλωριούχο βενζαλκόνιο 5 %, ενώ παραδείγματα θετικών μαρτύρων για στερεές ελεγχόμενες ουσίες είναι το υδροξείδιο του νατρίου ή το ιμιδαζόλιο.

34. Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται σαν σημείο αναφοράς είναι χρήσιμες για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικού ερεθισμού άγνωστων χημικών ουσιών συγκεκριμένης χημικής κατηγορίας ή κατηγορίας προϊόντων ή για την αξιολόγηση του σχετικού ερεθιστικού δυναμικού ενός ερεθιστικού των οφθαλμών εντός συγκεκριμένου εύρους αποκρίσεων ερεθισμού.

Μετρούμενα τελικά σημεία

35. Οι κερατοειδείς που έχουν υποβληθεί σε αγωγή αξιολογούνται προ της αγωγής και στα 30, 75, 120, 180 και 240 λεπτά (± 5 λεπτά) από την έκπλυση που ακολουθεί την αγωγή. Τα χρονικά αυτά σημεία εξασφαλίζουν επαρκή αριθμό μετρήσεων κατά τη διάρκεια του τετράωρου διαστήματος αγωγής, παρέχοντας παράλληλα επαρκή χρόνο μεταξύ των μετρήσεων για τις απαιτούμενες παρατηρήσεις επί όλων των οφθαλμών.

36. Τα αξιολογούμενα τελικά σημεία είναι η αδιαφάνεια, το οίδημα του κερατοειδούς, η κατακράτηση φλουορεσκεΐνης και οι επιδράσεις στη μορφολογία (π.χ. εντύπωμα ή χαλάρωση του επιθηλίου). Όλα τα τελικά σημεία, με εξαίρεση την κατακράτηση φλουορεσκεΐνης (η οποία προσδιορίζεται μόνο προ της αγωγής και 30 λεπτά μετά την έκθεση στην ελεγχόμενη ουσίας) προσδιορίζονται σε καθένα από τα ανωτέρω τελικά σημεία.

37. Συνιστάται η λήψη φωτογραφιών για την τεκμηρίωση της αδιαφάνειας του κερατοειδούς, της κατακράτησης φλουορεσκεΐνης, των μορφολογικών επιδράσεων και, εάν διενεργείται, της παθολογοανατομικής εξέτασης.

38. Μετά την τελική εξέταση στις τέσσερις ώρες, συνιστάται στους χρήστες να διατηρούν τους οφθαλμούς σε κατάλληλο συντηρητικό (π.χ. ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης [φορμόλη]) για πιθανή παθολογοανατομική εξέταση.

▼**M2**

39. Το οίδημα του κερατοειδούς προσδιορίζεται βάσει μετρήσεων του πάχους του κερατοειδούς με οπτικό παχύμετρο σε σχισμοειδή λυχνία, εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό και υπολογίζεται βάσει του ακόλουθου τύπου:

$$\left[\frac{\textit{πάχος κερατοειδούς τη οτιγμή } t \; - \; \textit{πάχος κερατοειδούς τη οτιγμή } \; = \; 0}{\textit{πάχος κερατοειδούς τη οτιγμή } \; = \; 0}\right] \times 100$$

40. Υπολογίζεται το μέσο ποσοστό οιδήματος του κερατοειδούς για όλους τους οφθαλμούς της δοκιμής και για όλα τα χρονικά σημεία παρατήρησης. Βάσει της υψηλότερης μέσης βαθμολογίας για το οίδημα του κερατοειδούς, όπως παρατηρείται ανεξαρτήτως χρονικού σημείου, προκύπτει για κάθε ελεγχόμενη ουσία συνολική βαθμολογία κατηγορίας.

41. Η αδιαφάνεια του κερατοειδούς υπολογίζεται βάσει της επιφάνειας του κερατοειδούς με την πυκνότερη αδιαφάνεια. Υπολογίζεται η μέση αδιαφάνεια κερατοειδούς για όλους τους οφθαλμούς της δοκιμής και για όλα τα χρονικά σημεία παρατήρησης. Βάσει της υψηλότερης μέσης βαθμολογίας για την αδιαφάνεια του κερατοειδούς, όπως παρατηρείται ανεξαρτήτως χρονικού σημείου, προκύπτει για κάθε ελεγχόμενη ουσία συνολική βαθμολογία κατηγορίας (πίνακας 1).

Πίνακας 1

Βαθμολογία αδιαφάνειας κερατοειδούς

Βαθμολογία	Παρατήρηση
0	Δεν παρατηρείται αδιαφάνεια
0,5	Αμυδρή αδιαφάνεια
1	Διάσπαρτες ή διάχυτες αδιαφανείς περιοχές, σαφώς διακρινόμενες λεπτομέρειες της ίριδας
2	Ευδιάκριτη ημιδιαφανής επιφάνεια, ελαφρά συγκάλυψη των λεπτομερειών της ίριδας
3	Σοβαρή αδιαφάνεια του κερατοειδούς, πλήρης συγκάλυψη των λεπτομερειών της ίριδας, μόλις διακρινόμενο μέγεθος της κόρης
4	Πλήρως αδιαφανής κερατοειδής, μη διακρινόμενη ίριδα

42. Υπολογίζεται η μέση τιμή κατακράτησης φλουορεσκεΐνης για όλους τους οφθαλμούς της δοκιμής μόνο στο χρονικό σημείο παρατήρησης των 30 λεπτών, το οποίο χρησιμοποιείται για τη συνολική βαθμολογία κατηγορίας που προκύπτει για κάθε ελεγχόμενη ουσία (πίνακας 2).

Πίνακας 2

Βαθμολογία κατακράτησης φλουορεσκεΐνης

Βαθμολογία	Παρατήρηση
0	Δεν παρατηρείται κατακράτηση φλουορεσκεΐνης
0,5	Αμυδρή χρώση μεμονωμένων κυττάρων
1	Διάχυτη χρώση μεμονωμένων κυττάρων σε ολόκληρη την υποβληθείσα σε αγωγή επιφάνεια του κερατοειδούς
2	Εστιακή ή συρρέουσα πυκνή χρώση μεμονωμένων κυττάρων
3	Κατακράτηση φλουορεσκεΐνης σε μεγάλες συρρέουσες επιφάνειες

▼M2

43. Στις μορφολογικές επιδράσεις περιλαμβάνεται το «εντύπωμα» των επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς, η «χαλάρωση» του επιθηλίου, η «τράχυνση» της επιφάνειας του κερατοειδούς και η «πρόσφυση» της ελεγχόμενης ουσίας στον κερατοειδή. Τα ευρήματα αυτά ποικίλλουν σε σοβαρότητα και ενδέχεται να παρατηρούνται ταυτόχρονα. Η ταξινόμησή τους είναι υποκειμενική ανάλογα με την ερμηνεία του ερευνητή.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Αξιολόγηση των δεδομένων

44. Τα αποτελέσματα σχετικά με την αδιαφάνεια και το οίδημα του κερατοειδούς και με την κατακράτηση φλουορεσκεΐνης πρέπει να αξιολογούνται χωριστά ώστε να προκύπτει κατηγορία ICE για κάθε τελικό σημείο. Ακολούθως, οι κατηγορίες ICE για κάθε τελικό σημείο συνδυάζονται για την ταξινόμηση της ερεθιστικότητας κάθε ελεγχόμενης ουσίας.

Κριτήρια απόφασης

45. Μετά την αξιολόγηση κάθε τελικού σημείου, είναι εφικτή η κατάταξη σε κατηγορίες ICE βάσει προκαθορισμένου εύρους. Η ερμηνεία του πάχους του κερατοειδούς (πίνακας 3), της αδιαφάνειάς του (πίνακας 4) και της κατακράτησης φλουορεσκεΐνης (πίνακας 5) βάσει τεσσάρων κατηγοριών ICE πραγματοποιείται σύμφωνα με τις ακόλουθες κλίμακες:

Πίνακας 3

Κριτήρια ταξινόμησης ICE για το πάχος του κερατοειδούς

Μέσο οίδημα κερατοειδούς (%) (*)	Κατηγορία ICE
0 έως 5	I
> 5 έως 12	II
> 12 έως 18 (> 75 min μετά την αγωγή)	II
> 12 έως 18 (≤ 75 min μετά την αγωγή)	III
> 18 έως 26	III
> 26 έως 32 (> 75 min μετά την αγωγή)	III
> 26 έως 32 (≤ 75 min μετά την αγωγή)	IV
> 32	IV

(*) Η βαθμολογία οιδήματος του κερατοειδούς ισχύει μόνο εάν το πάχος μετράται με σχισμοειδή λυχνία Haag-Streit BP900, με παχύμετρο αριθ. I και ρύθμιση του πλάτους σχισμής στο 9½, ήτοι 0,095 mm. Οι χρήστες πρέπει να γνωρίζουν ότι από μικροσκόπια με τις σχισμοειδείς λυχνίες ενδέχεται να προκύψουν διαφορετικές μετρήσεις του πάχους του κερατοειδούς ανάλογα με το πλάτος της σχισμής.

Πίνακας 4

Κριτήρια ταξινόμησης ICE για την αδιαφάνεια

Μέση βαθμολογία μέγιστης αδιαφάνειας (*)	Κατηγορία ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Βλ. πίνακα 1.

▼**M2**

Πίνακας 5

Κριτήρια ταξινόμησης ICE για τη μέση κατακράτηση φλουορεσκεΐνης

Μέση βαθμολογία κατακράτησης φλουορεσκεΐνης στα 30 λεπτά μετά την αγωγή (*)	Κατηγορία ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Βλ. πίνακα 2.

46. Η συνολική ταξινόμηση ερεθιστικότητας *in vitro* για μια ελεγχόμενη ουσία αξιολογείται βάσει της ταξινόμησης ερεθιστικότητας που αντιστοιχεί στον συνδυασμό των κατηγοριών οιδήματος του κερατοειδούς, αδιαφάνειας του κερατοειδούς και κατακράτησης φλουορεσκεΐνης, όπως εμφαίνεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6

Συνολικές ταξινομήσεις ερεθιστικότητας *in vitro*

Ταξινόμηση	Συνδυασμοί των 3 τελικών σημείων
Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Αδιαφάνεια του κερατοειδούς ≥ 3 στα 30 min (σε τουλάχιστον 2 οφθαλμούς) Αδιαφάνεια του κερατοειδούς = 4 σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο (σε τουλάχιστον 2 οφθαλμούς) Σοβαρή χαλάρωση του επιθηλίου (σε τουλάχιστον 1 οφθαλμό)

(*) Λιγότερο πιθανοί συνδυασμοί.

47. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 1, εάν η ελεγχόμενη ουσία δεν χαρακτηρίζεται ως διαβρωτικό ή ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών, πρέπει να διεξάγονται επιπρόσθετες δοκιμές για ταξινόμηση και επισήμανση. Η μέθοδος δοκιμών ICE έχει συνολική ορθότητα 83 % (120/144) έως 87 % (134/154), ψευδοθετικό ποσοστό 6 % (7/122) έως 8 % (9/116) και ψευδοαρνητικό ποσοστό 41 % (13/32) έως 50 % (15/30) για τον χαρακτηρισμό διαβρωτικών και ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών, σε σύγκριση με τα δεδομένα από τη μέθοδο οφθαλμικών δοκιμών *in vivo* σε κουνέλια, τα οποία ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τα συστήματα ταξινόμησης της EPA (1), της ΕΕ (2) ή GHS (3). Όταν αποκλείονται από τη βάση δεδομένων οι ουσίες ορισμένων κατηγοριών, χημικών (αλκοόλες και επιφανειοδραστικά) και φυσικών (στερεά), η ορθότητα της ICE στα συστήματα ταξινόμησης της ΕΕ, της EPA και GHS κυμαίνεται από 91 % (75/82) έως 92 % (69/75), ενώ τα ψευδοθετικά ποσοστά κυμαίνονται από 5 % (4/73) έως 6 % (4/70) και τα ψευδοαρνητικά από 29 % (2/7) έως 33 % (3/9) (4).

48. Ακόμη και εάν μια ελεγχόμενη ουσία δεν ταξινομηθεί ως διαβρωτικό ή ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών, τα δεδομένα από την ICE μπορούν να χρησιμεύσουν, σε συνδυασμό με δεδομένα από την οφθαλμική δοκιμή *in vivo* σε κουνέλια ή από επαρκώς επικυρωμένη δοκιμή *in vitro*, στην περαιτέρω αξιολόγηση της σκοπιμότητας και των περιορισμών της μεθόδου δοκιμών ICE για τον χαρακτηρισμό μη ισχυρών ερεθιστικών και μη ερεθιστικών (καταρτίζεται έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με τη χρήση μεθόδων δοκιμών οφθαλμικής τοξικότητας *in vitro*).

▼M2

Κριτήρια αποδοχής της μελέτης

49. Μια δοκιμή θεωρείται αποδεκτή εάν για τους παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες ή μάρτυρες με φορέα/διαλύτη και τους παράλληλους θετικούς μάρτυρες προκύπτει ταξινόμηση ερεθιστικότητας που εμπίπτει στις κατηγορίες των μη ερεθιστικών και των ισχυρών ερεθιστικών/διαβρωτικών, αντιστοίχως.

Έκθεση δοκιμής

50. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, εφόσον αυτά έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης:

Ελεγχόμενες ουσίες και μάρτυρες

χημική(ές) ονομασία(ες), όπως ο συντακτικός τύπος που χρησιμοποιείται από την υπηρεσία Chemical Abstracts Service (CAS), συνοδευόμενη(ες) από άλλες ονομασίες, εφόσον είναι γνωστές

αριθμός μητρώου CAS (RN), εάν είναι γνωστός

καθαρότητα και σύνθεση της ουσίας ή του μείγματος (σε κατά βάρος εκατοστιαία αναλογία), εφόσον τα στοιχεία αυτά είναι διαθέσιμα

φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η φυσική κατάσταση, η πτητικότητα, το pH, η σταθερότητα, η χημική κατηγορία, η υδατοδιαλυτότητα, που έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης

τυχόν επεξεργασία των ελεγχόμενων ουσιών/μαρτύρων πριν από τη δοκιμή (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση)

σταθερότητα, εφόσον είναι γνωστή.

Πληροφορίες σχετικά με τον χορηγό και την εγκατάσταση δοκιμών

όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης

προέλευση των οφθαλμών (π.χ. εγκατάσταση από την οποία συλλέχθηκαν)

συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς των οφθαλμών (π.χ. ημερομηνία και χρόνος συλλογής των οφθαλμών, χρονικό διάστημα πριν από την έναρξη της δοκιμής)

εάν είναι διαθέσιμα, τα ειδικά χαρακτηριστικά των ζώων από τα οποία συλλέχθηκαν οι οφθαλμοί (π.χ. ηλικία, φύλο, βάρος του ζώου δότη).

Αιτιολόγηση της μεθόδου και του πρωτοκόλλου δοκιμής που χρησιμοποιούνται

Ακεραιότητα της μεθόδου δοκιμής

διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη διασφάλιση της ακεραιότητας (ορθότητα και αξιοπιστία) της μεθόδου δοκιμής με την πάροδο του χρόνου (π.χ. περιοδικές δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας, χρήση ιστορικών δεδομένων για τους αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες).

Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής

εάν υπάρχει, το αποδεκτό εύρος τιμών για τους παράλληλους μάρτυρες συγκριτικής αξιολόγησης βάσει ιστορικών δεδομένων.

Συνθήκες δοκιμής

περιγραφή του χρησιμοποιούμενου συστήματος δοκιμής

χρησιμοποιούμενη σχισμοειδής λυχνία (π.χ. μοντέλο)

ρυθμίσεις του χρησιμοποιούμενου μικροσκοπίου σχισμοειδούς λυχνίας

πληροφορίες σχετικά με τους χρησιμοποιούμενους οφθαλμούς ορνιθίων, συμπεριλαμβανομένων δηλώσεων σχετικά με την ποιότητά τους

▼**M2**

λεπτομέρειες σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία δοκιμής

χρησιμοποιούμενη(ες) συγκέντρωση(εις) της ελεγχόμενης ουσίας

περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής

παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα του μοντέλου (π.χ. αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, ουσίες ελέγχου ικανότητας, ουσίες που χρησιμοποιούνται σαν σημείο αναφοράς)

περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης.

Αποτελέσματα

περιγραφή άλλων παρατηρούμενων επιδράσεων

ανάλογα με την περίπτωση, φωτογραφίες του οφθαλμού.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006. ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.

(3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(6) ΕΚ (2006). Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006 , για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ. ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe IrritantsIsolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ακρίβεια: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μία από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών.

Ουσία: που χρησιμοποιείται σαν σημείο αναφοράς: ουσία που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία που χρησιμοποιείται σαν σημείο αναφοράς πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: (i) σταθερή(ές) και αξιόπιστη(ες) πηγή(ές), (ii) δομική και λειτουργική ομοιότητα προς την κατηγορία των ελεγχόμενων ουσιών, (iii) γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά, (iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και (v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Κερατοειδής: το διαφανές τμήμα του πρόσθιου τμήματος του οφθαλμικού βολβού το οποίο καλύπτει την ίριδα και την κόρη και επιτρέπει την είσοδο φωτός στο εσωτερικό του ματιού.

Αδιαφάνεια κερατοειδούς: μέτρηση του βαθμού θολερότητας του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης σε ελεγχόμενη ουσία. Η αυξημένη αδιαφάνειά του είναι ενδεικτική βλάβης του κερατοειδούς.

Οίδημα κερατοειδούς: αντικειμενική μέτρηση, στο πλαίσιο της δοκιμής ICE, του βαθμού διάτασης του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης σε ελεγχόμενη ουσία. Εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό και υπολογίζεται βάσει των αρχικών (προ της χορήγησης δόσης) μετρήσεων του πάχους του κερατοειδούς και των μετρήσεων του πάχους που καταγράφονται σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά την έκθεση στο ελεγχόμενο υλικό κατά τη δοκιμή ICE. Ο βαθμός οιδήματος του κερατοειδούς είναι ενδεικτικός βλάβης του κερατοειδούς.

Κατηγορία EPA 1: διάβρωση (μη αναστρέψιμη καταστροφή οφθαλμικού ιστού) ή προσβολή ή ερεθισμός του κερατοειδούς που εμμένει για περισσότερες από 21 ημέρες (1).

Κατηγορία ΕΕ R41: βλάβη οφθαλμικού ιστού ή σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, κατόπιν εφαρμογής ελεγχόμενης ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν αναστρέφεται πλήρως εντός 21 ημερών από την εφαρμογή (2).

Ψευδοαρνητικό ποσοστό: το ποσοστό όλων των θετικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως αρνητικές από μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί δείκτη των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Ψευδοθετικό ποσοστό: το ποσοστό όλων των αρνητικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως θετικές από μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί δείκτη των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

Κατακράτηση φλουορεσκεΐνης: υποκειμενική μέτρηση, στο πλαίσιο της δοκιμής ICE, του βαθμού κατακράτησης νατριούχου φλουορεσκεΐνης από τα κερατοειδικά επιθηλιακά κύτταρα κατόπιν έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία. Ο βαθμός κατακράτησης φλουορεσκεΐνης είναι ενδεικτικός βλάβης του κερατοειδικού επιθηλίου.

GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals/ΠΕΣ - Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένες κατηγορίες ταξινόμησης και κλίμακες φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις κινδύνου, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων, με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (3).

▼M2

Κατηγορία GHS 1: βλάβη οφθαλμικού ιστού ή σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, κατόπιν εφαρμογής ελεγχόμενης ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν αναστρέφεται πλήρως εντός 21 ημερών από την εφαρμογή (3).

Κίνδυνος: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιδράσεις όταν οργανισμός, σύστημα ή (υπό) πληθυσμός εκτεθεί στον συγκεκριμένο παράγοντα.

Αρνητικός μάρτυρας: δείγμα-αντίγραφο που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε αγωγή. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Μη ερεθιστικά: ουσίες που δεν ταξινομούνται ως ερεθιστικές για τους οφθαλμούς κατηγορίας EPA I, II, ή III ούτε κατηγορίας EE R41 ή R36 ούτε κατηγορίας GHS 1, 2A ή 2B (1)(2)(3).

Διαβρωτικό των οφθαλμών: α) ουσία που προκαλεί μη αναστρέψιμη βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς, β) ουσία που ταξινομείται ως διαβρωτική για τους οφθαλμούς κατηγορίας GHS 1, EPA I ή EE R41 (1)(2)(3).

Ερεθιστικό των οφθαλμών: α) ουσία που προκαλεί αναστρέψιμη αλλαγή στους οφθαλμούς κατόπιν εφαρμογής στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, β) ουσία που ταξινομείται ως ερεθιστική για τους οφθαλμούς κατηγορίας EPA II ή III, EE R36 ή GHS 2A ή 2B (1)(2)(3).

Ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών: α) ουσία που προκαλεί βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς, κατόπιν εφαρμογής στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν αναστρέφεται εντός 21 ημερών από την εφαρμογή, ή που προκαλεί σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, β) ουσία που ταξινομείται ως ερεθιστική για τους οφθαλμούς στην κατηγορία GHS 1, EPA I ή EE R41 (1)(2)(3).

Θετικός μάρτυρας: δείγμα-αντίγραφο που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλισθεί η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης στον θετικό μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της σοβαρής απόκρισης δεν πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαραχθεί ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά με την πάροδο του χρόνου όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Αξιολογείται μέσω υπολογισμού της ενδο- και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.

Σχισμοειδής λυχνία: όργανο για την απευθείας εξέταση του οφθαλμού υπό μεγέθυνση με διοφθάλμιο μικροσκόπιο μέσω της δημιουργίας στερεοσκοπικής όρθιας εικόνας. Στη μέθοδο δοκιμής ICE, το συγκεκριμένο όργανο χρησιμοποιείται για την απεικόνιση των πρόσθιων δομών του οφθαλμού ορνιθίου καθώς και για την αντικειμενική μέτρηση του πάχους του κερατοειδούς με προσαρτημένο παχύμετρο.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη ή του φορέα. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, με σκοπό τον καθορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία διαλυμένη στον ίδιο διαλύτη ή φορέα. Όταν το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο αρνητικό μάρτυρα, υποδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης ή ο φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

▼**M2**

Κλιμακωτή δοκιμή: στρατηγική δοκιμών κατά στάδια, στο πλαίσιο της οποίας όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια ελεγχόμενη ουσία εξετάζονται με συγκεκριμένη σειρά, με χρήση διαδικασίας βάρους της απόδειξης σε κάθε στάδιο, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο, αν για μια απόφαση ταξινόμησης κινδύνου διατίθενται επαρκείς πληροφορίες. Εάν σε ελεγχόμενη ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό ερεθιστικότητας βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών δεν είναι εφικτή η απόδοση δυναμικού ερεθιστικότητας σε ελεγχόμενη ουσία, εφαρμόζεται κλιμακωτή διαδικασία διαδοχικών ελέγχων σε ζώα έως ότου καταστεί εφικτή η βέβαιη ταξινόμηση της ουσίας.

Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών: μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ορθότητα και η αξιοπιστία επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών ενδέχεται να μην επαρκούν για την αποδοχή της για τον προτεινόμενο σκοπό.

Βάρος της απόδειξης: η διαδικασία εξέτασης των πλεονεκτημάτων και των αδυναμιών διαφόρων πληροφοριών για τη συναγωγή και την τεκμηρίωση συμπεράσματος σχετικά με την επικινδυνότητα μιας ουσίας.

▼**M2**

Προσάρτημα 2

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ ICE

Πριν από την ένταξη μιας μεθόδου δοκιμών που συμφωνεί με την παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών στην καθημερινή πρακτική, τα εργαστήρια ενδέχεται να επιθυμούν να αποδείξουν την τεχνική τους ικανότητα προσδιορίζοντας ορθά την ταξινόμηση της διαβρωτικότητας των 10 συνιστώμενων στον πίνακα 1 ουσιών για τους οφθαλμούς. Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων για τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση των οφθαλμών, το οποίο βασίζεται στα αποτελέσματα της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια (TG 405) (κατηγορίες 1, 2A, 2B ή χωρίς ταξινόμηση και επισήμανση σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (3)(7)). Λαμβανομένης, ωστόσο, υπόψη της επικυρωμένης σκοπιμότητας των δοκιμασιών αυτών (δηλ. μόνο για τον χαρακτηρισμό διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών), η ικανότητα αποδεικνύεται μόνο με δύο αποτελέσματα δοκιμών για ταξινόμηση (διαβρωτικό/ισχυρό ερεθιστικό ή μη διαβρωτικό/μη ισχυρό ερεθιστικό). Άλλα κριτήρια επιλογής αφορούσαν τη διαθεσιμότητα των ουσιών στο εμπόριο και την ύπαρξη υψηλής ποιότητας δεδομένων αναφοράς *in vivo*, καθώς και δεδομένων υψηλής ποιότητας από τις δύο μεθόδους *in vitro* για τις οποίες καταρτίζονται κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών. Για τον λόγο αυτό, οι ερεθιστικές ουσίες επιλέχθηκαν από τον συνιστώμενο από την ICCVAM κατάλογο 122 ουσιών αναφοράς για την επικύρωση μεθόδων δοκιμών οφθαλμικής τοξικότητας *in vitro* (βλ. Appendix H: ICCVAM Recommended Reference Substances/Προσάρτημα Η: Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς της ICCVAM) (4). Τα δεδομένα αναφοράς διατίθενται στα Background Review Documents (έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων) της ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας του κερατοειδούς στα βοοειδή (BCOP) και τη μέθοδο δοκιμών ICE (18) (19).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη της τεχνικής ικανότητας ως προς τη δοκιμή ICE

Χημική ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία ([1])	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση *In Vivo* ([2])	Ταξινόμηση *In Vitro* ([3])
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (5 %)	8001-54-5	Κατιονική ένωση	Υγρό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Χλωρεξιδίνη	55-56-1	Αμίνη, αμιδίνη	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
L-τρυγικό διβενζοΰλιο	2743-38-6	Εστέρας καρβοξυλικού οξέος	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Ιμιδαζόλιο	288-32-4	Ετεροκυκλική ένωση	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Τριχλωροξικό οξύ (30 %)	76-03-9	Καρβοξυλικό οξύ	Υγρό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
2,6-διχλωροβενζοϋλοχλωρίδιο	4659-45-4	Ακυλαλογονίδιο	Υγρό	Κατηγορία 2A	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
2-μεθυλακετοξικό αιθύλιο	609-14-3	Κετονεστέρας	Υγρό	Κατηγορία 2B	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
Νιτρικό αμμώνιο	6484-52-2	Ανόργανο άλας	Στερεό	Κατηγορία 2A	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό

▼**M2**

Χημική ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία ([1])	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση *In Vivo* ([2])	Ταξινόμηση *In Vitro* ([3])
Γλυκερίνη	56-81-5	Αλκοόλη	Υγρό	Χωρίς επισήμανση	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
n-εξάνιο	110-54-3	Υδρογονάνθρακας (άκυκλος)	Υγρό	Χωρίς επισήμανση	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό

Συντμήσεις: CASRN = Αριθμός Μητρώου της Chemical Abstracts Service

([1]) Κάθε ελεγχόμενη ουσία κατατάχθηκε σε χημική κατηγορία σύμφωνα με τυποποιημένο σύστημα ταξινόμησης, βάσει του συστήματος ταξινόμησης Medical Subject Headings (MeSH) της National Library of Medicine (θεματικές επικεφαλίδες ιατρικού περιεχομένου της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης, διατίθεται στον δικτυακό τόπο http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Βάσει των αποτελεσμάτων της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια (OECD TG 405) και σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (3)(7).

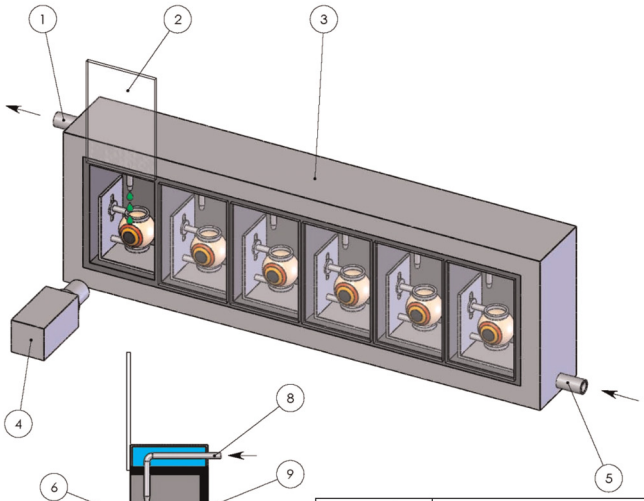
([3]) Βάσει των αποτελεσμάτων των μεθόδων δοκιμών BCOP και ICE.

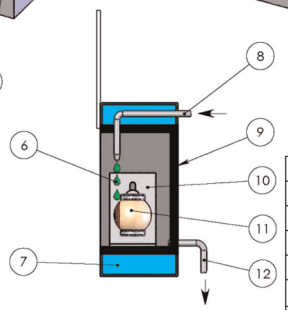
▼**M2**

Προσάρτημα 3

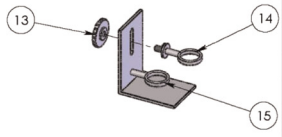
Διαγράμματα συσκευής υπέρτηξης και σφιγκτήρα οφθαλμών

(Βλ. Burton et al. (17) για περαιτέρω γενική περιγραφή της συσκευής υπέρτηξης και του σφιγκτήρα οφθαλμών)





ΔΙΑΤΑΞΗ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΟΦΘΑΛΜΩΝ



ΔΙΑΤΟΜΗ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΟΣ

ΑΡΙΘ. ΑΝΤ/ΝΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1	ΕΞΟΔΟΣ ΘΕΡΜΟΥ ΝΕΡΟΥ
2	ΣΥΡΟΜΕΝΗ ΘΥΡΑ
3	ΣΥΣΚΕΥΗ ΥΠΕΡΤΗΞΗΣ
4	ΕΞΟΔΟΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΟΡΟΥ
5	ΕΙΣΟΔΟΣ ΘΕΡΜΟΥ ΝΕΡΟΥ
6	ΔΙΑΛΥΜΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΟΡΟΥ
7	ΘΕΡΜΟ ΝΕΡΟ
8	ΕΙΣΟΔΟΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΟΡΟΥ
9	ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑ
10	ΔΙΑΤΑΞΗ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΟΦΘΑΛΜΟΥ
11	ΟΦΘΑΛΜΟΣ ΟΡΝΙΘΙΟΥ
12	ΕΞΟΔΟΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΟΡΟΥ
13	ΚΟΧΛΙΑΣ ΣΤΕΡΕΩΣΗΣ
14	ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΟΣ ΑΝΩ ΒΡΑΧΙΟΝΑΣ
15	ΣΤΑΘΕΡΟΣ ΚΑΤΩ ΒΡΑΧΙΟΝΑΣ

▼M3

Β.49. ΔΟΚΙΜΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ IN VITRO

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η δοκιμασία μικροπυρήνων in vitro (MNvit) αποτελεί δοκιμή γονιδιοτοξικότητας για την ανίχνευση μικροπυρήνων στο κυτταρόπλασμα των μεσοφασικών κυττάρων. Οι μικροπυρήνες μπορεί να προέρχονται από άκεντρα (δηλαδή χωρίς κεντρομερίδιο) τμήματα χρωμοσώματος ή από ολόκληρα χρωμοσώματα που δεν είναι ικανά να μετακινηθούν προς τους πόλους κατά το στάδιο ανάφασης της κυτταρικής διαίρεσης. Με τη δοκιμασία ανιχνεύεται η δράση κλαστογόνων και ανευπλοειδογόνων χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) (1) (2) σε κύτταρα που διαιρέθηκαν κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία ή μετά από αυτή. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει τη δυνατότητα χρήσης πρωτοκόλλου με ή χωρίς τον αναστολέα πολυμερισμού της ακτίνης κυτταροχαλασίνη (κυτοχαλασίνη) Β (cytoB). Η προσθήκη cytoB πριν από τη στοχευόμενη μίτωση επιτρέπει τον προσδιορισμό και την επιλεκτική ανάλυση της συχνότητας σχηματισμού μικροπυρήνων σε κύτταρα που έχουν ολοκληρώσει μία μίτωση, καθώς τα κύτταρα αυτά είναι διπύρηνα (3) (4). Η παρούσα μέθοδος παρέχει επίσης τη δυνατότητα χρήσης πρωτοκόλλων χωρίς αναστολή της κυτταροκίνησης, με την προϋπόθεση ότι υπάρχουν στοιχεία από τα οποία προκύπτει ότι ο αναλυόμενος κυτταρικός πληθυσμός έχει υποστεί μίτωση.

2. Εκτός από τη χρήση της δοκιμασίας MNvit για την αναγνώριση χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) που επάγουν μικροπυρήνες, πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς πρόκλησης χρωμοσωματικών βλαβών και σχηματισμού μικροπυρήνων είναι επίσης δυνατόν να συγκεντρωθούν με αναστολή της κυτταροκίνησης, ανοσοχημική σήμανση κινητοχώρου ή με υβριδισμό με ανιχνευτές κεντρομεριδίου/τελομεριδίου (FISH, από τα αρχικά των λέξεων fluorescence *in situ* hybridisation/υβριδισμός in situ με φθορισμό) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Οι διαδικασίες σήμανσης και υβριδισμού μπορούν να χρησιμοποιούνται όταν αυξάνεται ο σχηματισμός μικροπυρήνων και ο ερευνητής επιθυμεί να διαπιστώσει αν η αύξηση οφείλεται σε κλαστογόνα και/ή ανευπλοειδογόνα συμβάντα.

3. Οι μικροπυρήνες αποτελούν βλάβη που μεταβιβάζεται στα θυγατρικά κύτταρα, ενώ οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες που καταγράφονται σε μεταφασικά κύτταρα είναι δυνατόν να μη μεταβιβάζονται. Λόγω της δυνατότητας σχετικά αντικειμενικής εκτίμησης των μικροπυρήνων σε μεσοφασικά κύτταρα, το εργαστηριακό προσωπικό πρέπει μόνο να διαπιστώνει αν τα κύτταρα έχουν ή όχι διαιρεθεί και πόσα κύτταρα περιέχουν μικροπυρήνα. Συνεπώς, είναι δυνατή η σχετικά ταχεία καταμέτρηση των παρασκευασμάτων και η αυτοματοποίηση της ανάλυσης. Αυτό καθιστά πρακτικά εφικτή την καταμέτρηση χιλιάδων αντί εκατοντάδων κυττάρων ανά αγωγή, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ισχύς της δοκιμασίας. Τέλος, επειδή μικροπυρήνες μπορούν να προκύψουν από καθυστερούντα χρωμοσώματα, παρέχεται η δυνατότητα ανίχνευσης παραγόντων που επάγουν ανευπλοειδία και οι οποίοι είναι δύσκολο να μελετηθούν με συμβατικές δοκιμές χρωμοσωματικών ανωμαλιών, π.χ. με την κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 473 (κεφάλαιο Β.10 του παρόντος παραρτήματος) (17). Ωστόσο, με τη δοκιμασία MNvit δεν είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των χημικών ουσιών που επάγουν πολυπλοειδία και των κλαστογόνων ουσιών, χωρίς τη χρήση ειδικών τεχνικών, όπως η FISH που περιγράφεται στην παράγραφο 2.

4. Η δοκιμασία MNvit είναι μέθοδος in vitro, στην οποία χρησιμοποιούνται συνήθως καλλιεργημένα κύτταρα ανθρώπου ή τρωκτικών. Παρέχει εκτεταμένη βάση για την in vitro διερεύνηση του δυναμικού πρόκλησης χρωμοσωματικών βλαβών, χάρη στη δυνατότητα ανίχνευσης τόσο των ανευπλοειδογόνων όσο και των κλαστογόνων ουσιών.

5. Η δοκιμασία MNvit είναι αυτοδύναμη και αποτελεσματική σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, παρουσία ή μη cytoB. Εκτενή δεδομένα υποστηρίζουν την εγκυρότητα της δοκιμασίας MNvit με τη χρήση διαφόρων κυτταρικών σειρών τρωκτικών (CHO, V79, CHL/IU και L5178Y) και ανθρώπινων λεμφοκυττάρων (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται, ειδικότερα, οι διεθνείς μελέτες επικύρωσης που συντόνισε η γαλλική επιστημονική εταιρεία

▼M3

Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) και οι εκθέσεις του International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Τα διαθέσιμα δεδομένα επαναξιολογήθηκαν επίσης στο πλαίσιο μελέτης αναδρομικής επικύρωσης με ανάλυση βάρους της μαρτυρίας, η οποία διεξήχθη από το Ευρωπαϊκό Κέντρο Επικύρωσης Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM) της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, και η μέθοδος δοκιμών κρίθηκε επιστημονικά έγκυρη από την επιστημονική συμβουλευτική επιτροπή (ESAC) του ECVAM (32) (33) (34). Έχει επίσης περιγραφεί η χρήση της σειράς ανθρώπινων λεμφοβλαστοειδών κυττάρων TK6 (35), των κυττάρων HepG2 (36) (37) και πρωτογενών εμβρυϊκών κυττάρων του είδους χάμστερ Mesocricetus auratuscells (38), τα οποία όμως δεν έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες επικύρωσης.

ΟΡΙΣΜΟΙ

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

7. Οι δοκιμές που διεξάγονται in vitro απαιτούν κατά κανόνα τη χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης, εκτός εάν τα κύτταρα διαθέτουν ικανότητα μεταβολισμού των ελεγχόμενων ουσιών. Τα εξωγενή συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μιμούνται απόλυτα τις συνθήκες in vivo. Πρέπει επίσης να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η χρήση συνθηκών που μπορεί να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικά αποτελέσματα, τα οποία μπορεί να μην οφείλονται σε εγγενή μεταλλαξιγένεση αλλά σε παράγοντες όπως η σημαντική αλλαγή του pH ή της ωσμωτικότητας ή τα υψηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας (39) (40) (41). Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία μεταβάλλει το pH του θρεπτικού υλικού όταν προστίθεται σε αυτό, το pH πρέπει να ρυθμίζεται, κατά προτίμηση με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο διάλυμα παρακαταθήκης κατά τρόπο ώστε όλοι οι όγκοι να παραμένουν αμετάβλητοι σε όλες τις συγκεντρώσεις δοκιμής και για όλους τους μάρτυρες.

8. Βασικής σημασίας για την ανάλυση της επαγωγής μικροπυρήνων είναι να συντελείται μίτωση τόσο στις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή, όσο και σε εκείνες που δεν υποβάλλονται. Το πιο διαφωτιστικό στάδιο για την καταμέτρηση των μικροπυρήνων είναι η ολοκλήρωση μιας μίτωσης των κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία ή μετά από αυτή.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

9. Καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων ή κυττάρων θηλαστικών εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία, με και χωρίς εξωγενή πηγή μεταβολικής ενεργοποίησης, εκτός εάν χρησιμοποιούνται κύτταρα με επαρκή μεταβολική ικανότητα. Σε όλες τις δοκιμές συμπεριλαμβάνονται χημικές ουσίες ως παράλληλοι μάρτυρες φορέα/διαλύτη και θετικοί μάρτυρες.

10. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία ή μετά από αυτή, τα κύτταρα καλλιεργούνται για επαρκές χρονικό διάστημα ώστε η βλάβη του χρωμοσώματος ή της ατράκτου να προκαλέσει τον σχηματισμό μικροπυρήνων σε μεσοφασικά κύτταρα. Για την επαγωγή ανευπλοειδίας χρειάζεται συνήθως η παρουσία της ελεγχόμενης ουσίας κατά τη μίτωση. Τα μεσοφασικά κύτταρα συλλέγονται και, ύστερα από χρώση, αναλύονται για να διαπιστωθεί η παρουσία μικροπυρήνων. Στην ιδανική περίπτωση, θα πρέπει να καταμετρώνται μόνο μικροπυρήνες κυττάρων τα οποία ολοκλήρωσαν μια μίτωση κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία ή της περιόδου μετά την έκθεση, εάν προβλέπεται. Στις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή με αναστολέα κυτταροκίνησης, αυτό επιτυγχάνεται με την καταμέτρηση μόνο των διπύρηνων κυττάρων. Εάν δεν χρησιμοποιείται αναστολέας κυτταροκίνησης, έχει σημασία να καταδεικνύεται ότι τα αναλυόμενα κύτταρα πιθανώς διαιρέθηκαν κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία ή μετά από αυτή. Για όλα τα πρωτόκολλα, έχει σημασία να καταδεικνύεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων τόσο στις καλλιέργειες-μάρτυρες όσο και σε εκείνες που υποβάλλονται σε αγωγή, στις δε καλλιέργειες στις οποίες καταμετρώνται οι μικροπυρήνες (ή σε παράλληλες καλλιέργειες) πρέπει να εκτιμάται ο βαθμός κυτταροτοξικότητας ή κυτταρόστασης που επάγει η ελεγχόμενη ουσία.

▼M3

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προετοιμασία

11. Μπορούν να χρησιμοποιούνται καλλιεργημένα πρωτογενή ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερειακού αίματος (5) (19) (42) (43) και ορισμένες κυτταρικές σειρές τρωκτικών, όπως οι CHO, V79, CHL/IU και L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Η χρήση άλλων κυτταρικών σειρών και τύπων πρέπει να αιτιολογείται με βάση τις αποδεδειγμένες επιδόσεις τους στη δοκιμασία, όπως περιγράφεται στην ενότητα «Κριτήρια αποδοχής». Δεδομένου ότι η συχνότητα υποβάθρου του σχηματισμού μικροπυρήνων επηρεάζει την ευαισθησία της δοκιμασίας, συνιστάται η χρήση κυτταρικών τύπων με χαμηλή και σταθερή συχνότητα υποβάθρου όσον αφορά τον σχηματισμό μικροπυρήνων.

12. Τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερειακού αίματος πρέπει να λαμβάνονται από νέα (ηλικίας 18-35 ετών περίπου) και υγιή άτομα που δεν καπνίζουν και δεν έχουν γνωστό ιστορικό πρόσφατης έκθεσης σε γονιδιοτοξικές χημικές ουσίες ή σε ακτινοβολία. Σε περίπτωση συνένωσης για χρήση κυττάρων από περισσότερους του ενός δότες, πρέπει να προσδιορίζεται ο αριθμός των δοτών. Η συχνότητα σχηματισμού μικροπυρήνων αυξάνεται με την ηλικία, περισσότερο στις γυναίκες απ' ό,τι στους άνδρες (44), γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην επιλογή δοτών κυττάρων για συνένωση.

Θρεπτικά υλικά και συνθήκες καλλιέργειας

13. Για τις καλλιέργειες πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλο θρεπτικό υλικό και κατάλληλες συνθήκες επώασης (δοχεία καλλιέργειας, συγκέντρωση CO_2, θερμοκρασία και υγρασία). Οι καθιερωμένες κυτταρικές σειρές και στελέχη πρέπει να ελέγχονται τακτικά ως προς τη σταθερότητα του τυπικού αριθμού χρωμοσωμάτων και την απουσία μόλυνσης από μυκόπλασμα και να μην χρησιμοποιούνται εάν έχει μεταβληθεί ο τυπικός αριθμός χρωμοσωμάτων. Πρέπει να είναι γνωστή η κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου στις συνθήκες καλλιέργειας που χρησιμοποιεί το εργαστήριο δοκιμών. Εάν εφαρμόζεται η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης, η συγκέντρωση του αναστολέα κυτταροκίνησης πρέπει να βελτιστοποιείται για τον συγκεκριμένο τύπο κυττάρων και να έχει αποδεδειγμένα ικανοποιητική απόδοση σε διπύρηνα κύτταρα για καταμέτρηση.

Παρασκευή των καλλιεργειών

14. Καθιερωμένες κυτταρικές σειρές και στελέχη: τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται από μητρικές καλλιέργειες, ανακαλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό, σε πυκνότητα τέτοια ώστε οι καλλιέργειες να μη γίνονται συρρέουσες σε μονοστιβάδα και οι καλλιέργειες σε εναιώρημα να μην φθάνουν σε κατάσταση υπέρμετρης πυκνότητας πριν από τον χρόνο συλλογής, και επωάζονται στους 37 °C.

15. Λεμφοκύτταρα: ολικό (πλήρες) αίμα κατεργασμένο με αντιθρομβωτικό (π.χ. ηπαρίνη) ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα καλλιεργούνται παρουσία μιτωγόνου (π.χ. φυτοαιμοσυγκολλητίνη/PHA) πριν εκτεθούν στην ελεγχόμενη ουσία και στην cytoB.

Μεταβολική ενεργοποίηση

16. Όταν χρησιμοποιούνται κύτταρα με ανεπαρκή ενδογενή μεταβολική ικανότητα, πρέπει να χρησιμοποιούνται εξωγενή συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (S9), το οποίο παρασκευάζεται από το ήπαρ τρωκτικών που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες, όπως το Aroclor 1254 (45) (46) ή ο συνδυασμός φαινοβαρβιτόνης και β-ναφθοφλαβόνης (46) (47) (48) (49). Ο συνδυασμός αυτός δεν αντιβαίνει στη σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους (50) και στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 850/2004 για τους έμμονους οργανικούς ρύπους (66), ενώ έχει αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματικός με το Aroclor 1254 στην επαγωγή οξειδασών μεικτής λειτουργίας (46) (47) (48) (49). Το κλάσμα S9 χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις 1-10 % v/v στο τελικό μέσο θρεπτικό υλικό δοκιμής. Ο όρος που αφορά το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης ενδέχεται να εξαρτάται από την τάξη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να ενδείκνυται η χρήση περισσότερων της μιας συγκεντρώσεων του S9.

▼M3

17. Οι κυτταρικές σειρές που είναι προϊόν γενετικής μηχανικής και εκφράζουν συγκεκριμένα ενεργοποιητικά ένζυμα του ανθρώπου ή των τρωκτικών μπορούν να καταργήσουν την ανάγκη για εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης και να χρησιμοποιηθούν ως κύτταρα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, η επιλογή των χρησιμοποιούμενων κυτταρικών σειρών πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικά, π.χ. με βάση την καταλληλότητα των οξειδασών μεικτής λειτουργίας για τον μεταβολισμό της ελεγχόμενης ουσίας (51) και τον βαθμό απόκρισής τους σε γνωστές κλαστογόνες και ανευπλοειδογόνες ουσίες (βλέπε χωριστή ενότητα για τα κριτήρια αποδοχής). Επισημαίνεται ότι η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να μη μεταβολίζεται από την ή τις εκφραζόμενες οξειδάσες μεικτής λειτουργίας. Στην περίπτωση αυτή, τα αρνητικά αποτελέσματα δεν υποδηλώνουν ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν μπορεί να επάγει τον σχηματισμό μικροπυρήνων.

Παρασκεύασμα της ελεγχόμενης ουσίας

18. Πριν από την αγωγή των κυττάρων, οι στερεές χημικές ουσίες πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον ενδείκνυται. Οι υγρές ουσίες μπορούν να προστίθενται κατευθείαν στα συστήματα δοκιμής και/ή να αραιώνονται πριν από την αγωγή. Οι αέριες ή πτητικές ουσίες πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή με κατάλληλες τροποποιήσεις των τυπικών πρωτοκόλλων, π.χ. αγωγή σε σφραγισμένα δοχεία (52) (53). Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

Συνθήκες δοκιμής

Διαλύτες/φορείς

19. Ο διαλύτης/φορέας δεν πρέπει να αντιδρά με την ελεγχόμενη ουσία ούτε να είναι ασύμβατος με την επιβίωση των κυττάρων ή τη διατήρηση της δραστικότητας του S9 στη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση. Η χρήση άλλων διαλυτών/φορέων εκτός από τους καθιερωμένους (π.χ. νερό, θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας, διμεθυλοσουλφοξείδιο) πρέπει να υποστηρίζεται από δεδομένα από τα οποία προκύπτει ότι είναι συμβατοί με την ελεγχόμενη ουσία και δεν είναι γονιδιοτοξικοί. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατόν, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα χρήσης υδατικού διαλύτη/φορέα.

Χρήση cytoB ως αναστολέα κυτταροκίνησης

20. Μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας MNvit είναι να εξασφαλίζεται ότι τα καταμετρούμενα κύτταρα ολοκλήρωσαν μια μίτωση κατά τη διάρκεια της αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία ή της περιόδου επώασης μετά την αγωγή, εάν προβλέπεται. Η CytoB είναι ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος παράγοντας για την αναστολή της κυτταροκίνησης, καθώς αναστέλλει τη συγκρότηση της ακτίνης και, κατ' επέκταση, εμποδίζει τον αποχωρισμό των θυγατρικών κυττάρων μετά τη μίτωση, προκαλώντας τον σχηματισμό διπύρηνων κυττάρων (5) (54) (55). Ως εκ τούτου η καταμέτρηση των μικροπυρήνων μπορεί να περιοριστεί μόνο στα κύτταρα που υπέστησαν μίτωση κατά τη διάρκεια της αγωγής ή μετά από αυτή. Είναι δυνατόν να μετρηθεί ταυτόχρονα η επίδραση της ελεγχόμενης ουσίας στην κινητική του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Όταν χρησιμοποιούνται ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, πρέπει να χρησιμοποιείται CytoB ως αναστολέας κυτταροκίνησης, λόγω της μεταβλητότητας της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου εντός των καλλιεργειών και μεταξύ των δοτών, καθώς και του γεγονότος ότι δεν αντιδρούν όλα τα λεμφοκύτταρα στην PHA. Στις δοκιμές με κυτταρικές σειρές έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες μέθοδοι για τη διαπίστωση της διαίρεσης των καταμετρούμενων κυττάρων, οι οποίες εξετάζονται κατωτέρω (βλέπε παράγραφο 26).

21. Το εργαστήριο πρέπει να καθορίζει, για κάθε τύπο κυττάρων, την κατάλληλη συγκέντρωση cytoB για την επίτευξη της βέλτιστης συχνότητας διπύρηνων κυττάρων στις καλλιέργειες-μάρτυρες με φορέα/διαλύτη. Η κατάλληλη συγκέντρωση cytoB κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 3 and 6 μg/ml.

▼M3

Μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας και επιλογή των συγκεντρώσεων έκθεσης

22. Κατά τον καθορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης δοκιμής της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να αποφεύγονται οι συγκεντρώσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε τεχνητά θετικές αποκρίσεις, όπως εκείνες που προκαλούν υπέρμετρη κυτταροτοξικότητα, καθίζηση στο θρεπτικό υλικό και σημαντική αλλαγή του pH ή της ωσμωτικότητας (39) (40) (41).

23. Μετράται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός για να εξασφαλίζεται ότι τα υποβαλλόμενα σε αγωγή κύτταρα υφίστανται μίτωση κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας και ότι η αγωγή διεξάγεται σε κατάλληλα επίπεδα κυτταροτοξικότητας (βλέπε παράγραφο 29). Στα κύτταρα που χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση, η κυτταροτοξικότητα πρέπει να προσδιορίζεται με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, μέσω της σχετικής αύξησης του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων (RICC) ή του σχετικού διπλασιασμού του πληθυσμού (RPD) (βλέπε μαθηματικούς τύπους στο προσάρτημα 2), εκτός εάν χρησιμοποιείται cytoB. Εφόσον χρησιμοποιείται cytoB, η κυτταροτοξικότητα μπορεί να προσδιορίζεται μέσω του δείκτη αναδιπλασιασμού (RI) (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

24. Η κατεργασία των καλλιεργειών με cytoB και η μέτρηση της σχετικής συχνότητας των μονοπύρηνων, διπύρηνων και πολυπύρηνων κυττάρων στην καλλιέργεια παρέχουν μια ορθή μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού της επίδρασης της αγωγής στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και της κυτταροτοξικής ή κυτταροστατικής δράσης της (5) και εξασφαλίζουν την καταμέτρηση μόνο των κυττάρων εκείνων που διαιρέθηκαν κατά τη διάρκεια της αγωγής ή μετά από αυτή.

25. Στις μελέτες με cytoB, η κυτταρόσταση/κυτταροτοξικότητα είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ποσοτικά μέσω του δείκτη πολλαπλασιασμού με αναστολή κυτταροκίνησης (CBPI) (5), (26), (56) ή να συναχθεί από τον δείκτη RI, από 500 τουλάχιστον κύτταρα ανά καλλιέργεια (βλέπε μαθηματικούς τύπους στο προσάρτημα 2). Όταν χρησιμοποιείται cytoB για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ο δείκτης CBPI ή RI πρέπει να προσδιορίζεται από 500 τουλάχιστον κύτταρα ανά καλλιέργεια. Οι μετρήσεις αυτές, μεταξύ άλλων, μπορούν να χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας με τη σύγκριση των τιμών που αντιστοιχούν στις καλλιέργειες αγωγής και στις καλλιέργειες-μάρτυρες. Η αξιολόγηση άλλων δεικτών κυτταροτοξικότητας (π.χ. συρρέουσα καλλιέργεια, κυτταρικός αριθμός, απόπτωση, νέκρωση, καταμέτρηση μετάφασης) μπορεί να παράσχει χρήσιμες πληροφορίες.

26. Στις μελέτες χωρίς cytoB, είναι αναγκαίο να καταδεικνύεται ότι τα καταμετρούμενα κύτταρα της καλλιέργειας διαιρέθηκαν κατά τη διάρκεια της αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία ή μετά από αυτή. Σε αντίθετη περίπτωση, υπάρχει το ενδεχόμενο ψευδαρνητικών αποκρίσεων. Μεταξύ των μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξασφάλιση της καταμέτρησης διαιρεθέντων κυττάρων συγκαταλέγονται η ενσωμάτωση και, στη συνέχεια, η ανίχνευση βρωμοδεσοξυουριδίνης (BrdU) με σκοπό την αναγνώριση των κυττάρων που έχουν αναδιπλασιαστεί (57), η κλωνοποίηση στις περιπτώσεις αγωγής και καταμέτρησης in situ, σε αντικειμενοφόρο πλάκα, κυττάρων από μόνιμες κυτταρικές σειρές [δείκτης πολλαπλασιασμού (PI)] (25) (26) (27) (28), η μέτρηση του σχετικού διπλασιασμού του πληθυσμού (RPD) ή της σχετικής αύξησης του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων (RICC) και άλλες αποδεδειγμένες μέθοδοι (16) (56) (58) (59) (βλέπε μαθηματικούς τύπους στο προσάρτημα 2). Η αξιολόγηση άλλων δεικτών κυτταροτοξικότητας ή κυταρόστασης (π.χ. συρρέουσα καλλιέργεια, κυτταρικός αριθμός, απόπτωση, νέκρωση, καταμέτρηση μετάφασης) μπορεί να παράσχει χρήσιμες πληροφορίες.

27. Θα πρέπει να αξιολογούνται τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις δοκιμής που επιδέχονται ανάλυση. Για να επιτευχθεί αυτό, μπορεί να είναι απαραίτητη η εκτέλεση του πειράματος με μεγαλύτερο πλήθος συγκεντρώσεων που δεν απέχουν πολύ μεταξύ τους και η ανάλυση του σχηματισμού μικροπυρήνων στις συγκεντρώσεις που παρέχουν το κατάλληλο φάσμα κυτταροτοξικότητας. Εναλλακτική στρατηγική είναι η διεξαγωγή προκαταρτικής δοκιμής κυτταροτοξικότητας για τον περιορισμό του εύρους συγκεντρώσεων της τελικής δοκιμής.

28. Με την υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να επιδιώκεται κυτταροτοξικότητα 55 ± 5 %. Σε υψηλότερα επίπεδα, η κυτταροτοξικότητα ενδέχεται να έχει ως δευτερογενές αποτέλεσμα χρωμοσωματικές βλάβες (60). Σε περίπτωση κυτταροτοξικότητας, οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις δοκιμής πρέπει να εκτείνονται από τη συγκέντρωση που προκαλεί κυτταροτοξικότητα 55 ± 5 % μέχρι εκείνη που προκαλεί ελάχιστη ή μηδενική κυτταροτοξικότητα.

▼M3

29. Εάν δεν παρατηρηθεί κυτταροτοξικότητα ή ίζημα, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής πρέπει να αντιστοιχεί στη μικρότερη από τις τιμές 0,01 M, 5 mg/mL ή 5 μl/mL. Κατά κανόνα, η απόσταση μεταξύ των επιλεγόμενων για ανάλυση συγκεντρώσεων πρέπει να μην υπερβαίνει τον παράγοντα 10. Προκειμένου για ουσίες με μεγάλη κλίση καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης, μπορεί να είναι απαραίτητη η ελάττωση της απόστασης μεταξύ των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας, ώστε να γίνεται καταμέτρηση και στις καλλιέργειες των κλιμάκων μεσαίας και χαμηλής τοξικότητας.

30. Όταν η διαλυτότητα αποτελεί περιοριστικό παράγοντα, η υψηλότερη συγκέντρωση, εφόσον δεν περιορίζεται από την κυτταροτοξικότητα, πρέπει να είναι η μικρότερη συγκέντρωση στην οποία οι καλλιέργειες παρουσιάζουν το ελάχιστο ορατό ίζημα, με την προϋπόθεση να μην παρεμποδίζεται η καταμέτρηση. Η καθίζηση πρέπει να αξιολογείται με μεθόδους όπως η οπτική μικροσκοπία, ενώ πρέπει να καταγράφεται το ίζημα που εμμένει ή εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (το αργότερο στο τέλος της αγωγής).

Μάρτυρες

31. Σε κάθε πείραμα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες και μάρτυρες διαλύτη/φορέα, με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση.

32. Οι θετικοί μάρτυρες χρειάζονται για να καταδεικνύεται η ικανότητα αναγνώρισης των κλαστογόνων και των ανευπλοειδογόνων ουσιών από τα χρησιμοποιούμενα κύτταρα και από το πρωτόκολλο δοκιμής και για να επιβεβαιώνεται η μεταβολική ικανότητα του παρασκευάσματος S9. Οι θετικοί μάρτυρες πρέπει, αφενός, να είναι ουσίες που είναι γνωστό ότι επάγουν τον σχηματισμό μικροπυρήνων σε συγκεντρώσεις οι οποίες αναμένεται να οδηγήσουν σε μικρές αλλά αναπαραγώγιμες αυξήσεις έναντι της τιμής υποβάθρου και, αφετέρου, να καταδεικνύουν την ευαισθησία του συστήματος δοκιμής. Οι συγκεντρώσεις των θετικών μαρτύρων πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή, αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων πλακών στον παρατηρητή.

33. Για να καταδειχθεί τόσο η μεταβολική ικανότητα όσο και η ικανότητα του συστήματος δοκιμής να ανιχνεύει τις κλαστογόνες χημικές ουσίες, πρέπει να χρησιμοποιείται κλαστογόνος ουσία που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση (π.χ. κυκλοφωσφαμίδιο, βενζο[a]πυρένιο). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι θετικοί μάρτυρες, αυτό όμως πρέπει να αιτιολογείται. Δεδομένου ότι ορισμένοι θετικοί μάρτυρες που χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση ενδέχεται να είναι ενεργοί, χωρίς εξωγενή μεταβολική ενεργοποίηση, σε ορισμένες συνθήκες αγωγής ή για ορισμένες κυτταρικές σειρές, η ανάγκη μεταβολικής ενεργοποίησης και η δραστικότητα του παρασκευάσματος S9 πρέπει να ελέγχονται με την κυτταρική σειρά και στις συγκεντρώσεις που έχουν επιλεγεί.

34. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν ανευπλοειδογόνες ουσίες για τις οποίες να είναι γνωστό ότι απαιτείται μεταβολική ενεργοποίηση προκειμένου να έχουν γονιδιοτοξική δράση (16). Παραδείγματα αποδεκτών, επί του παρόντος, θετικών μαρτύρων ανευπλοειδογόνου δράσης είναι η κολχικίνη και η βινβλαστίνη. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι θετικοί μάρτυρες, εφόσον επάγουν τον σχηματισμό μικροπυρήνων αποκλειστικά ή πρωτίστως με ανευπλοειδογόνο δράση. Για να μην χρειάζονται δύο θετικοί μάρτυρες χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση (ένας για την κλαστογένεση και ένας για την ανευπλοειδογένεση), ο μάρτυρας ανευπλοειδογένεσης μπορεί να λειτουργήσει ως θετικός μάρτυρας χωρίς S9, ενώ ο μάρτυρας κλαστογένεσης μπορεί να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της επάρκειας του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Στην περίπτωση των κυττάρων που δεν απαιτούν S9 πρέπει να χρησιμοποιούνται θετικοί μάρτυρες, τόσο για την κλαστογένεση όσο και για την ανευπλοειδογένεση. Οι συνιστώμενοι θετικοί μάρτυρες περιλαμβάνονται στο προσάρτημα 3.

35. Μπορεί να εξετάζεται η χρήση θετικών μαρτύρων παρόμοιας χημικής τάξης, εφόσον υπάρχουν κατάλληλες ουσίες. Όλοι οι χρησιμοποιούμενοι θετικοί μάρτυρες πρέπει να είναι οι ενδεδειγμένοι για τον τύπο των κυττάρων και τις συνθήκες ενεργοποίησης.

▼M3

36. Για κάθε χρόνο συλλογής πρέπει να συμπεριλαμβάνονται μάρτυρες διαλύτη/φορέα. Επιπλέον, πρέπει να χρησιμοποιούνται και αρνητικοί μάρτυρες (χωρίς διαλύτη/φορέα) που δεν υποβάλλονται σε αγωγή, εκτός εάν υπάρχουν δημοσιευμένα δεδομένα ή ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου που καταδεικνύουν ότι ο επιλεγμένος διαλύτης δεν έχει γονιδιοτοξικές ή άλλες επιβλαβείς επιδράσεις στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Πρόγραμμα αγωγής

37. Για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας ανίχνευσης μιας ανευπλοειδογόνου ή κλαστογόνου ουσίας που δρα σε συγκεκριμένο στάδιο του κυτταρικού κύκλου, έχει μεγάλη σημασία η αγωγή επαρκών αριθμών κυττάρων με την ελεγχόμενη ουσία σε όλα τα στάδια του κύκλου τους. Συνεπώς, το πρόγραμμα αγωγής των κυτταρικών σειρών και των καλλιεργειών πρωτογενών κυττάρων μπορεί να διαφέρει ως έναν βαθμό από εκείνο των λεμφοκυττάρων, τα οποία χρειάζονται μιτωγόνο διέγερση για να αρχίσουν τον κύκλο τους. Το θέμα αυτό εξετάζεται στις παραγράφους 41 έως 43 (16).

38. Θεωρητικές εκτιμήσεις, σε συνδυασμό με δημοσιευμένα δεδομένα (18), παρέχουν ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες οι περισσότερες ανευπλοειδογόνες και κλαστογόνες ουσίες ανιχνεύονται με βραχύχρονη αγωγή 3 έως 6 ωρών, με και χωρίς S9, ακολουθούμενη από απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας και φάση ανάπτυξης 1,5-2,0 κυτταρικών κύκλων (6). Λαμβάνονται δείγματα κυττάρων σε χρόνο 1,5 έως 2,0 φορές μεγαλύτερο από την κανονική διάρκεια (δηλαδή χωρίς αγωγή) του κυτταρικού κύκλου, είτε μετά την έναρξη της αγωγής είτε στο τέλος της (βλέπε πίνακα 1). Οι χρόνοι δειγματοληψίας ή αποκατάστασης είναι δυνατόν να παραταθούν, εάν είναι γνωστό ή υπάρχουν υπόνοιες ότι η ελεγχόμενη ουσία επηρεάζει τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (π.χ. στις δοκιμές ουσιών ανάλογων με νουκλεοζίτες).

39. Λόγω της δυνητικής τοξικότητας των παρασκευασμάτων S9 για τα καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών, η αγωγή με παρατεταμένη έκθεση επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου εφαρμόζεται μόνο χωρίς S9. Στην παρατεταμένη αγωγή παρέχεται η δυνατότητα επιλογής μεταξύ της αγωγής των κυττάρων με την ελεγχόμενη χημική ουσία με ή χωρίς cytoB. Με αυτή τη δυνατότητα επιλογής αντιμετωπίζονται οι περιπτώσεις προβληματισμού σχετικά με τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ελεγχόμενης ουσίας και της cytoB.

40. Τα συνιστώμενα προγράμματα αγωγής κυττάρων εμφαίνονται στον πίνακα 1. Τα γενικά αυτά προγράμματα αγωγής μπορούν να τροποποιούνται ανάλογα με τη σταθερότητα και τη δραστικότητα της ελεγχόμενης ουσίας ή με τα ιδιαίτερα αυξητικά χαρακτηριστικά των χρησιμοποιούμενων κυττάρων. Κάθε αγωγή πρέπει να αρχίζει και να τελειώνει όταν τα κύτταρα βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Τα εν λόγω προγράμματα αναλύονται στις επόμενες παραγράφους 41-47.

Πίνακας 1

Χρόνοι αγωγής και συλλογής κυττάρων για τη δοκιμασία MNvit

Λεμφοκύτταρα, πρωτογενή κύτταρα και κυτταρικές σειρές που υποβάλλονται σε αγωγή με cytoB	+ S9	Αγωγή επί 3-6 ώρες παρουσία S9, απομάκρυνση του S9 και του θρεπτικού υλικού αγωγής, προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και cytoB, συλλογή μετά παρέλευση χρόνου ίσου με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου
	– S9 Σύντομη έκθεση	Αγωγή επί 3-6 ώρες, απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού αγωγής, προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και cytoB, συλλογή μετά παρέλευση χρόνου ίσου με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου

▼M3

	– S9 Παρατεταμένη έκθεση	*Επιλογή Α:* Αγωγή επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου παρουσία cytoB, συλλογή στο τέλος της περιόδου έκθεσης *Επιλογή Β:* Αγωγή επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας, προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και cytoB, συλλογή μετά παρέλευση χρόνου ίσου με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου
Κυτταρικές σειρές που υποβάλλονται σε αγωγή χωρίς cytoB (Τα προγράμματα αγωγής που παρατίθενται ανωτέρω, με τη διαφορά ότι δεν προστίθεται cytoB.)		

Λεμφοκύτταρα, πρωτογενή κύτταρα και κυτταρικές σειρές με cytoB

41. Η αποτελεσματικότερη προσέγγιση για τα λεμφοκύτταρα συνίσταται στην έναρξη της έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία 44-48 ώρες μετά τη διέγερση με PHA, όταν έχει παύσει ο συγχρονισμός του κύκλου (5). Στην αρχική δοκιμή, τα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία επί 3-6 ώρες, με και χωρίς S9. Το θρεπτικό υλικό αγωγής απομακρύνεται και αντικαθίσταται από νέο υλικό που περιέχει cytoB και τα κύτταρα συλλέγονται μετά παρέλευση χρόνου ίσου με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

42. Εάν τα αποτελέσματα και των δύο αρχικών δοκιμών με σύντομη έκθεση (3-6 ώρες) είναι αρνητικά ή αμφίβολα, ακολουθεί αγωγή παρατεταμένης έκθεσης χωρίς S9. Παρέχονται δύο εναλλακτικές δυνατότητες αγωγής, οι οποίες είναι εξίσου αποδεκτές. Ωστόσο, για τα διεγερμένα λεμφοκύτταρα, η λογαριθμική ανάπτυξη των οποίων ενδέχεται να είναι μειωμένη μετά την πάροδο 96 ωρών από τη διέγερση, μπορεί να ενδείκνυται περισσότερο η επιλογή Α. Επίσης, στην επιλογή Β, οι κυτταροκαλλιέργειες δεν πρέπει να είναι συρρέουσες κατά τον χρόνο της τελικής δειγματοληψίας.

— Επιλογή Α: Τα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και συλλέγονται στο τέλος της περιόδου αγωγής.

— Επιλογή Β: Τα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Το θρεπτικό υλικό αγωγής απομακρύνεται και αντικαθίσταται από νέο υλικό και τα κύτταρα συλλέγονται μετά από επιπλέον χρόνο ίσο με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

43. Τα πρωτογενή κύτταρα και οι κυτταρικές σειρές πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή με τρόπο παρόμοιο με των λεμφοκυττάρων, με τη διαφορά ότι δεν είναι απαραίτητη η διέγερσή τους με PHA επί 44-48 ώρες. Τα άλλα κύτταρα πλην των λεμφοκυττάρων πρέπει να εκτίθενται κατά τρόπο ώστε να βρίσκονται ακόμη στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης κατά τον χρόνο τερματισμού της μελέτης.

Κυτταρικές σειρές χωρίς cytoB

44. Τα κύτταρα πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή επί 3-6 ώρες, με και χωρίς S9. Το θρεπτικό υλικό αγωγής απομακρύνεται και αντικαθίσταται από νέο υλικό και τα κύτταρα συλλέγονται μετά παρέλευση χρόνου ίσου με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

▼M3

45. Εάν τα αποτελέσματα και των δύο αρχικών δοκιμών με σύντομη έκθεση (3-6 ώρες) είναι αρνητικά ή αμφίβολα, ακολουθεί αγωγή παρατεταμένης έκθεσης (χωρίς S9). Παρέχονται δύο εναλλακτικές δυνατότητες αγωγής, οι οποίες είναι εξίσου αποδεκτές.

— Επιλογή Α: Τα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και συλλέγονται στο τέλος της περιόδου αγωγής.

— Επιλογή Β: Τα κύτταρα υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία επί 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Το θρεπτικό υλικό αγωγής απομακρύνεται και αντικαθίσταται από νέο υλικό και τα κύτταρα συλλέγονται μετά από επιπλέον χρόνο ίσο με 1,5-2,0 φορές την κανονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

46. Στο τέλος της περιόδου αγωγής των 3-6 ωρών είναι πιθανή η παρουσία μιτωτικών κυττάρων (αναγνωρίζονται από το στρογγυλό σχήμα τους και από την απόσπασή τους από την επιφάνεια) στις μονοστιβάδες. Επειδή τα εν λόγω μιτωτικά κύτταρα αποσπώνται εύκολα, είναι πιθανή η απώλειά τους κατά την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού που περιέχει την ελεγχόμενη ουσία. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για τη συλλογή τους κατά την έκπλυση των καλλιεργειών και την επαναφορά τους σε αυτές, ώστε να αποφεύγεται η απώλεια κυττάρων που υφίστανται μίτωση κατά τον χρόνο της συλλογής και διατρέχουν κίνδυνο σχηματισμού μικροπυρήνων.

Αριθμός καλλιεργειών

47. Πρέπει να χρησιμοποιείται διπλή καλλιέργεια για κάθε συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας, καθώς και για τους μάρτυρες φορέα/διαλύτη και τους αρνητικούς. Εφόσον είναι δυνατόν να αποδειχθεί, με βάση ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου, ότι η μεταβλητότητα μεταξύ των δύο καλλιεργειών είναι ελάχιστη, μπορεί να γίνει δεκτή η χρήση μιας μόνο καλλιέργειας. Σε περίπτωση χρήσης μιας μόνο καλλιέργειας, συνιστάται να αυξάνεται το πλήθος των συγκεντρώσεων της ανάλυσης.

Συλλογή των κυττάρων και ετοιμασία των αντικειμενοφόρων πλακών

48. Η συλλογή και η επεξεργασία των κυττάρων πραγματοποιούνται σε κάθε καλλιέργεια χωριστά. Η ετοιμασία των κυτταρικών παρασκευασμάτων μπορεί να περιλαμβάνει κατεργασία με υπότονο διάλυμα. Ωστόσο, το στάδιο αυτό δεν είναι απαραίτητο, εάν επιτυγχάνεται κατάλληλη επίστρωση των κυττάρων με άλλον τρόπο. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές ετοιμασίας αντικειμενοφόρων πλακών, με την προϋπόθεση ότι προκύπτουν υψηλής ποιότητας κυτταρικά παρασκευάσματα για καταμέτρηση. Το κυτταρόπλασμα πρέπει να διατηρείται ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των μικροπυρήνων και (στη μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης) η αξιόπιστη αναγνώριση των διπύρηνων κυττάρων.

49. Για τη χρώση των αντικειμενοφόρων πλακών μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, όπως η χρωστική Giemsa ή ειδικά για το DNA φθοριοχρώματα (59). Με τη χρήση ειδικής για το DNA χρώσης [π.χ. πορτοκαλί της ακριδίνης (61) ή Hoechst 33258 και πυρονίνη-Y (62)] είναι δυνατόν να εξαλειφθούν ορισμένα από τα τεχνητά αποτελέσματα που οφείλονται στη χρήση μη ειδικών για το DNA χρώσεων. Εάν ενδιαφέρει να συγκεντρωθούν στοιχεία σχετικά με τον μηχανισμό του σχηματισμού μικροπυρήνων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντισώματα κινητοχώρου, η μέθοδος FISH με παγκεντρομερικούς ανιχνευτές DNA ή η σήμανση in situ (PRINS) με παγκεντρομερικούς εκκινητές, σε συνδυασμό με κατάλληλη για DNA χρώση αντίθεσης, για την αναγνώριση του περιεχομένου των μικροπυρήνων (ακέραιο χρωμόσωμα/τμήμα χρωμοσώματος) (15) (16). Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες μέθοδοι διάκρισης μεταξύ κλαστογόνων και ανευπλοειδογόνων ουσιών, εάν έχει αποδειχθεί η αποτελεσματικότητά τους.

Ανάλυση

50. Όλες οι αντικειμενοφόρες πλάκες, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που αντιστοιχούν στον φορέα/διαλύτη και στους μάρτυρες, πρέπει να λαμβάνουν ανεξάρτητο κωδικό πριν από τη μικροσκοπική εξέταση. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η ανάλυση των κωδικοποιημένων δειγμάτων με αυτόματο σύστημα κυτταρομετρίας ροής ή ανάλυσης εικόνων.

▼M3

51. Στις κατεργασμένες με cytoB καλλιέργειες, η συχνότητα σχηματισμού μικροπυρήνων πρέπει να εξετάζεται τουλάχιστον σε 2 000 διπύρηνα κύτταρα ανά συγκέντρωση (τουλάχιστον 1 000 διπύρηνα κύτταρα ανά καλλιέργεια, δύο καλλιέργειες ανά συγκέντρωση). Εάν χρησιμοποιείται μόνο μία καλλιέργεια, πρέπει να καταμετρώνται από αυτή τουλάχιστον 2 000 διπύρηνα κύτταρα ανά συγκέντρωση. Εάν σε κάθε συγκέντρωση είναι διαθέσιμα για καταμέτρηση σημαντικά λιγότερα από 1 000 διπύρηνα κύτταρα ανά καλλιέργεια (ή 2 000, σε περίπτωση χρήσης μόνο μιας καλλιέργειας) και δεν διαπιστωθεί σημαντική αύξηση των μικροπυρήνων, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί με περισσότερα κύτταρα ή με λιγότερο τοξικές συγκεντρώσεις, αναλόγως του ποιο από τα δύο ενδείκνυται. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην καταμετρώνται διπύρηνα κύτταρα που έχουν ανώμαλο σχήμα ή των οποίων οι δύο πυρήνες παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά μεγέθους. Επίσης, δεν πρέπει να συγχέονται τα διπύρηνα κύτταρα με ελλιπώς επιστρωμένα πολυπύρηνα. Τα κύτταρα που περιέχουν περισσότερους από δύο κύριους πυρήνες δεν πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία μικροπυρήνων, δεδομένου ότι η βασική συχνότητα σχηματισμού μικροπυρήνων μπορεί να είναι υψηλότερη σε αυτά (63) (64). Η καταμέτρηση μονοπύρηνων κυττάρων είναι αποδεκτή, εάν έχει αποδειχθεί ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν παρεμποδίζει τη δράση της cytoB.

52. Στις κυτταρικές σειρές που υποβάλλονται στη δοκιμασία χωρίς κατεργασία με cytoB, πρέπει να καταμετρώνται οι μικροπυρήνες τουλάχιστον σε 2 000 διπύρηνα κύτταρα ανά συγκέντρωση (τουλάχιστον 1 000 κύτταρα ανά καλλιέργεια, δύο καλλιέργειες ανά συγκέντρωση). Σε περίπτωση χρήσης μόνο μιας καλλιέργειας ανά συγκέντρωση, πρέπει να καταμετρώνται από αυτή τουλάχιστον 2 000 κύτταρα.

53. Όταν χρησιμοποιείται cytoB, πρέπει να προσδιορίζεται ο δείκτης CBPI ή RI, τουλάχιστον από 500 κύτταρα ανά καλλιέργεια, για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (βλέπε προσάρτημα 2). Στις περιπτώσεις αγωγής χωρίς cytoB, είναι θεμελιώδους σημασίας η παροχή στοιχείων από τα οποία προκύπτει ο πολλαπλασιασμός των καταμετρούμενων κυττάρων, όπως εξηγείται στις παραγράφους 24-27.

Κριτήρια αποδοχής

54. Το εργαστήριο που προτείνει τη χρήση της δοκιμασίας MNvit η οποία περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών πρέπει να αποδεικνύει την ικανότητά του να ανιχνεύει, με αξιοπιστία και ορθότητα, χημικές ουσίες γνωστής ανευπλοειδογόνου και κλαστογόνου δράσης, με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, καθώς και γνωστές αρνητικές χημικές ουσίες, χρησιμοποιώντας τις χημικές ουσίες αναφοράς που παρατίθενται στο προσάρτημα 3. Προκειμένου να αποδείξει την οικεία ικανότητα ορθής εφαρμογής της παρούσας μεθόδου δοκιμών, το εργαστήριο πρέπει να παρέχει στοιχεία από τα οποία προκύπτει ότι, εάν η δοκιμή διεξάγεται χωρίς τη χρήση cytoB, τα κύτταρα που καταμετρώνται για σχηματισμό μικροπυρήνων έχουν ολοκληρώσει μία πυρηνική διαίρεση.

55. Συνιστάται η χρήση των χημικών ουσιών του προσαρτήματος 3 ως ουσιών αναφοράς. Μπορούν να συμπεριλαμβάνονται υποκατάστατα αυτών ή συμπληρωματικές χημικές ουσίες, εάν η δραστικότητά τους είναι γνωστή, εάν επάγουν μικροπυρήνες με τους ίδιους μηχανισμούς δράσης και εάν είναι αποδεδειγμένα συναφείς με τις χημικές ουσίες που θα υποβάλλονται σε δοκιμή με τη διαδικασία MNvit Η σχετική αιτιολόγηση μπορεί να περιλαμβάνει μελέτη επικύρωσης στην οποία χρησιμοποιήθηκε ευρύ φάσμα ουσιών ή η οποία επικεντρώθηκε σε στενότερο φάσμα, με βάση τη χημική τάξη της ελεγχόμενης ουσίας ή τον μελετώμενο μηχανισμό πρόκλησης βλάβης.

56. Για τους μάρτυρες φορέα/διαλύτη και τις καλλιέργειες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή πρέπει να προκύπτουν αναπαραγώγιμες χαμηλές και σταθερές συχνότητες σχηματισμού μικροπυρήνων (συνήθως 5-25 μικροπυρήνες ανά 1 000 κύτταρα για τους τύπους κυττάρων που προσδιορίζονται στην παράγραφο 11). Άλλοι τύποι κυττάρων ενδέχεται να εμφανίζουν διαφορετικά φάσματα αποκρίσεων, τα οποία πρέπει να προσδιορίζονται κατά την επικύρωση της χρήσης των εν λόγω τύπων στη δοκιμασία MNvit. Τα δεδομένα από τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες, καθώς και από τους μάρτυρες διαλύτη πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό ιστορικών πεδίων τιμών για τους μάρτυρες. Η απόφαση σχετικά με τη σκοπιμότητα της χρήσης παράλληλου θετικού/αρνητικού μάρτυρα σε ένα πείραμα πρέπει να βασίζεται στις τιμές αυτές.

▼M3

57. Εάν προτείνονται μικρές τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου της δοκιμασίας (π.χ. χρήση αυτόματων τεχνικών καταμέτρησης αντί των μη αυτόματων, χρήση νέου τύπου κυττάρων), πρέπει να καταδεικνύεται η αποτελεσματικότητα της μεταβολής για να μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτή η χρήση του τροποποιημένου πρωτοκόλλου. Η αποτελεσματικότητα καταδεικνύεται, μεταξύ άλλων, με επίδειξη της δυνατότητας να ανιχνεύονται οι κύριοι μηχανισμοί θραύσης και προσθήκης ή απώλειας χρωμοσώματος και να επιτυγχάνονται τα ενδεδειγμένα θετικά και αρνητικά αποτελέσματα για την τάξη της μεμονωμένης ουσίας ή του ευρέος φάσματος ουσιών που θα υποβάλλεται στη δοκιμή.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

58. Εάν εφαρμόζεται η τεχνική της αναστολής της κυτταροκίνησης, μόνο οι συχνότητες διπύρηνων κυττάρων με μικροπυρήνες (ανεξαρτήτως του αριθμού μικροπυρήνων ανά κύτταρο) χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της επαγωγής μικροπυρήνων. Η καταγραφή του αριθμού κυττάρων με έναν, δύο ή περισσότερους μικροπυρήνες μπορεί να παράσχει χρήσιμες πληροφορίες, αλλά δεν είναι υποχρεωτική.

59. Πρέπει να προσδιορίζονται παράλληλα μέτρα κυτταροτοξικότητας και/ή κυτταρόστασης για όλες τις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή και τις καλλιέργειες-μάρτυρες φορέα/διαλύτη (58). Όταν εφαρμόζεται η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης, πρέπει να υπολογίζεται ο δείκτης CBPI ή RI ως μέτρο της καθυστέρησης του κυτταρικού κύκλου, για όλες τις καλλιέργειες που υποβάλλονται σε αγωγή και τις καλλιέργειες-μάρτυρες. Εάν δεν χρησιμοποιείται cytoB, πρέπει να υπολογίζεται ο δείκτης RPD ή RICC ή PI (βλέπε προσάρτημα 2).

60. Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε καλλιέργεια. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα.

61. Η επαγωγή μικροπυρήνων από χημικές ουσίες στη δοκιμασία MNvit ενδέχεται να οφείλεται σε θραύση ή απώλεια χρωμοσώματος ή στον συνδυασμό τους. Για να προσδιοριστεί αν ο μηχανισμός επαγωγής μικροπυρήνων συνδέεται με κλαστογόνο ή ανευπλοειδογόνο δράση, είναι δυνατόν να διεξαχθεί περαιτέρω ανάλυση με αντισώματα κινητοχώρου, κεντρομερικούς ανιχνευτές in situ ή με άλλες μεθόδους.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

62. Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφών θετικών ή αρνητικών αποκρίσεων με πρόσθετες δοκιμές. Τα αμφίβολα αποτελέσματα μπορούν να αποσαφηνίζονται με την εξέταση 1 000 επιπλέον κυττάρων, λαμβανόμενων από όλες τις καλλιέργειες, ώστε να τηρείται η τυφλότητα. Εάν το πρόβλημα δεν επιλύεται με την προσέγγιση αυτή, πρέπει να διεξάγονται περαιτέρω δοκιμές. Στα επαναληπτικά πειράματα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο τροποποίησης των παραμέτρων της μελέτης ώστε να καλύπτουν ένα διευρυμένο ή στενότερο πεδίο συνθηκών. Στις παραμέτρους που μπορούν να τροποποιούνται περιλαμβάνονται το εύρος των συγκεντρώσεων δοκιμής, οι χρόνοι αγωγής και συλλογής κυττάρων και/ή οι συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης.

63. Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα θετικό υπάρχουν διάφορα κριτήρια, όπως η σχετιζόμενη με τη συγκέντρωση ή στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχουν μικροπυρήνες. Πρέπει να εξετάζεται πρώτα η βιολογική συνάφεια των αποτελεσμάτων. Αν εξεταστεί το κατά πόσον οι παρατηρούμενες τιμές περικλείονται στο ιστορικό πεδίο τιμών για τους μάρτυρες, είναι δυνατόν να προκύψουν κατευθύνσεις για την αξιολόγηση της βιολογικής σημαντικότητας της απόκρισης. Μπορούν να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι ως βοήθημα κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών (65). Ωστόσο τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης πρέπει να αντιπαραβάλλονται με τη σχέση δόσης-απόκρισης. Πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη τα δεδομένα αναπαραγωγιμότητας και τα ιστορικά δεδομένα.

▼M3

64. Αν και από τα περισσότερα πειράματα προκύπτουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε ορισμένες περιπτώσεις η σειρά δεδομένων δεν επιτρέπει τη συναγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστικότητα της ελεγχόμενης ουσίας. Οι αποκρίσεις μπορεί να παραμένουν αμφίβολες ή αμφισβητήσιμες, ανεξάρτητα από το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

65. Τα θετικά αποτελέσματα της δοκιμασίας MNvit υποδηλώνουν ότι η ελεγχόμενη ουσία επάγει θραύση ή απώλεια χρωμοσώματος σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών. Τα αρνητικά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι, στις συνθήκες της δοκιμής, η ελεγχόμενη ουσία δεν επάγει θραύση και/ή προσθήκη ή απώλεια χρωμοσώματος σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών.

Έκθεση δοκιμής

66. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία, εφόσον αυτά έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης:

Ελεγχόμενη χημική ουσία

— στοιχεία ταυτότητας και αριθμοί CAS και EC,

— φυσική μορφή και καθαρότητα,

— φυσικοχημικές ιδιότητες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,

— ικανότητα αντίδρασης της ελεγχόμενης ουσίας με τον διαλύτη/φορέα ή τα θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας.

Διαλύτης/φορέας

— αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας στον διαλύτη/φορέα.

Κύτταρα

— τύπος και προέλευση των χρησιμοποιούμενων κυττάρων,

— καταλληλότητα του χρησιμοποιούμενου τύπου κυττάρων,

— απουσία μυκοπλάσματος, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— στοιχεία σχετικά με τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τον χρόνο διπλασιασμού ή τον δείκτη πολλαπλασιασμού,

— σε περίπτωση χρήσης λεμφοκυττάρων, φύλο, ηλικία και αριθμός των δοτών αίματος, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— σε περίπτωση χρήσης λεμφοκυττάρων, προσδιορίζεται αν εκτέθηκαν στην ουσία ολικό αίμα ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα,

— αριθμός ανακαλλιεργειών, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— μέθοδοι συντήρησης των κυτταροκαλλιεργειών, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— τυπικός αριθμός χρωμοσωμάτων,

— κανονική διάρκεια (αρνητικός μάρτυρας) του κυτταρικού κύκλου.

Συνθήκες δοκιμής

— ταυτότητα του αναστολέα κυτταροκίνησης (π.χ. cytoB), εάν χρησιμοποιείται, συγκέντρωση της ουσίας αυτής και διάρκεια έκθεσης των κυττάρων,

— αιτιολόγηση της επιλογής των συγκεντρώσεων και του αριθμού καλλιεργειών, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων για την κυτταροτοξικότητα και των περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας, εάν υπάρχουν,

— σύνθεση των θρεπτικών υλικών και συγκέντρωση CO_2, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας,

▼M3

— συγκέντρωση (και/ή όγκος) του φορέα και της ελεγχόμενης ουσίας που προστίθεται,

— θερμοκρασία και χρόνος επώασης,

— διάρκεια της αγωγής,

— χρόνος συλλογής μετά την αγωγή,

— πυκνότητα των κυττάρων στην ανακαλλιέργεια, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, συμπεριλαμβανομένων κριτηρίων αποδοχής,

— θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες,

— χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ετοιμασίας και τεχνική χρώσης αντικειμενοφόρων πλακών,

— κριτήρια αναγνώρισης μικροπυρήνων,

— αριθμοί εξετασθέντων κυττάρων,

— μέθοδοι μέτρησης της κυτταροτοξικότητας,

— τυχόν συμπληρωματικές πληροφορίες που αφορούν την κυτταροτοξικότητα,

— κριτήρια χαρακτηρισμού των μελετών ως θετικών, αρνητικών ή αμφίβολων,

— χρησιμοποιούμενες μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης,

— μέθοδοι, π.χ. χρήση αντισωμάτων κινητοχώρου, που χρησιμοποιούνται για να διαπιστωθεί αν οι μικροπυρήνες περιέχουν ολόκληρα χρωμοσώματα ή τμήματα χρωμοσωμάτων, εφόσον συντρέχει περίπτωση.

Αποτελέσματα

— χρησιμοποιούμενο μέτρο κυτταροτοξικότητας, π.χ. δείκτης CBPI ή RI, στην περίπτωση της μεθόδου αναστολής κυτταροκίνησης, δείκτης RICC, RPD ή PI, όταν δεν χρησιμοποιούνται μέθοδοι αναστολής κυτταροκίνησης· άλλες παρατηρήσεις, εφόσον συντρέχει περίπτωση, π.χ. συρρέουσα καλλιέργεια, απόπτωση, νέκρωση, καταμέτρηση μετάφασης, συχνότητα διπύρηνων κυττάρων,

— σημεία καθίζησης,

— δεδομένα για το pH και την οσμωτικότητα του θρεπτικού υλικού αγωγής, εφόσον προσδιορίστηκαν,

— ορισμός των αποδεκτών για εξέταση κυττάρων,

— κατανομή των μονοπύρηνων, διπύρηνων και πολυπύρηνων κυττάρων, εάν χρησιμοποιείται μέθοδος αναστολής κυτταροκίνησης,

— αριθμός κυττάρων με μικροπυρήνες ανά καλλιέργεια που υποβλήθηκε σε αγωγή και ανά καλλιέργεια-μάρτυρα, με τη διευκρίνιση αν πρόκειται για διπύρηνα ή μονοπύρηνα κύτταρα, εφόσον ενδείκνυται,

— σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατόν,

— δεδομένα για τους παράλληλους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες (συγκεντρώσεις και διαλύτες)·

— ιστορικά δεδομένα για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές, τυπικές αποκλίσεις και διάστημα εμπιστοσύνης (π.χ. 95 %),

— στατιστική ανάλυση, τιμές p, εάν υπάρχουν.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

▼M3

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.

(2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.

(3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen*., 35, 167-172.

(5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols, 2* (5), 1084-1104.

(6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.

(7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.

(8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.

▼M3

(17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [www.oecd.org/env/testguidelines]

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res*., 468, 137-163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.

▼**M3**

(31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.

(32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. 25η συνεδρίαση της ESAC, 16-17 Νοεμβρίου 2006, Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.

(41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen*., 8, 789-886.

(42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.

(43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* **37**, 31-45.

▼**M3**

(45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.

(50) UNEP (2001), σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους, Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το Περιβάλλον (UNEP). Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.pops.int/]

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.

(54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to «Report from the *in vitro* micronucleus assay working group», *Mutation Res.*, 564, 97-100.

(57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.

(60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191-201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.

(66) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 850/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, για τους έμμονους οργανικούς ρύπους και την τροποποίηση της οδηγίας 79/117/ΕΟΚ (ΕΕ L 229 της 30.4.2004, σ. 5).

▼M3

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Ανευπλοειδογόνος παράγοντας: κάθε ουσία ή διεργασία που προκαλεί ανευπλοειδία σε κύτταρα ή οργανισμούς, μέσω της αντίδρασής της με τα συστατικά του κυτταρικού κύκλου μιτωτικής και μειωτικής διαίρεσης.

Ανευπλοειδία: κάθε απόκλιση από τον φυσιολογικό διπλοειδή (ή απλοειδή) χρωμοσωματικό αριθμό που εμφανίζεται σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα, όχι όμως σε πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων (πολυπλοειδία).

Απόπτωση: προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από μια σειρά σταδίων που οδηγούν στη διάσπαση των κυττάρων προς συνδεδεμένα με την κυτταρική μεμβράνη σωματίδια τα οποία, στη συνέχεια, απομακρύνονται με φαγοκυττάρωση ή αποβολή.

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός: αύξηση του αριθμού των κυττάρων η οποία είναι αποτέλεσμα της μιτωτικής τους διαίρεσης.

Κεντρομερίδιο (ή κεντρομερές): περιοχή DNA του χρωμοσώματος στην οποία συγκρατούνται μεταξύ τους οι δύο χρωματίδες και είναι προσδεδεμένοι εκτέρωθεν οι δύο κινητοχώροι.

Κλαστογόνος παράγοντας: κάθε ουσία ή διεργασία που προκαλεί δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες σε πληθυσμούς κυττάρων ή οργανισμούς.

Κυτταροκίνηση: η διαδικασία κυτταρικής διαίρεσης αμέσως μετά τη μίτωση για τον σχηματισμό δύο θυγατρικών κυττάρων, το καθένα από τα οποία περιέχει έναν μόνο πυρήνα.

Δείκτης πολλαπλασιασμού με αναστολή κυτταροκίνησης (CBPI): το ποσοστό κυττάρων από δεύτερη διαίρεση στον υποβαλλόμενο σε αγωγή πληθυσμό σε σχέση με τον μάρτυρα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Κυτταρόσταση: αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2)

Κυτταροτοξικότητα: επιβλαβείς επιδράσεις στη δομή ή τη λειτουργία του κυττάρου, με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο.

Γονιδιοτοξική δράση: γενικός όρος που καλύπτει όλα τα είδη βλαβών του DNA ή του χρωμοσώματος, στις οποίες συγκαταλέγονται η θραύση, η προσθήκη, η αναδιάταξη, η μετάλλαξη, οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες και η ανευπλοειδία. Δεν προκαλούν όλες οι γονιδιοτοξικές επιδράσεις μεταλλάξεις ή σταθερές βλάβες του χρωμοσώματος.

Μεσοφασικά κύτταρα: κύτταρα που δεν βρίσκονται στο μιτωτικό στάδιο.

Κινητοχώρος: πρωτεϊνική δομή που συναρμολογείται στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος και με την οποία ενώνονται οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, κατευθύνοντας την τακτική κίνηση των θυγατρικών χρωμοσωμάτων προς τους πόλους των θυγατρικών κυττάρων.

Μικροπυρήνες: μικροί πυρήνες, διακριτοί από τους κύριους πυρήνες των κυττάρων και επιπρόσθετοι, οι οποίοι παράγονται κατά τη διάρκεια της τελόφασης της μίτωσης (μείωση) από καθυστερούντα τμήματα χρωμοσώματος ή ολόκληρα χρωμοσώματα.

Μίτωση: διαίρεση του κυτταρικού πυρήνα, η οποία συνήθως χωρίζεται σε πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση.

Μιτωτικός δείκτης: ο λόγος των κυττάρων που βρίσκονται σε μετάφαση διά του συνολικού αριθμού των κυττάρων που παρατηρούνται σε έναν κυτταρικό πληθυσμό· αποτελεί ένδειξη του βαθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού του συγκεκριμένου πληθυσμού.

Μεταλλαξιογόνος παράγοντας: παράγοντας που προκαλεί κληρονομήσιμη μεταβολή είτε μιας ή περισσότερων ακολουθιών ζευγών βάσεων του DNA στα γονίδια είτε της δομής των χρωμοσωμάτων (χρωμοσωματικές ανωμαλίες).

▼**M3**

Μη αποχωρισμός: αδυναμία των ζευγών χρωματίδων να αποχωριστούν και να διαχωριστούν σωστά στα αναπτυσσόμενα θυγατρικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τα θυγατρικά κύτταρα να μην έχουν κανονικό αριθμό χρωμοσωμάτων.

Πολυπλοειδία: αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες κυττάρων ή οργανισμών, οι οποίες αφορούν πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων, σε αντίθεση με εκείνες που αφορούν ένα ή περισσότερα μεμονωμένα χρωμοσώματα (ανευπλοειδία).

Δείκτης πολλαπλασιασμού (PI): μέθοδος μέτρησης της κυτταροτοξικότητας, όταν δεν χρησιμοποιείται κυτταροχαλασίνη Β (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Σχετική αύξηση του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων (RICC): μέθοδος μέτρησης της κυτταροτοξικότητας, όταν δεν χρησιμοποιείται κυτταροχαλασίνη Β (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Σχετικός διπλασιασμός του πληθυσμού (RPD): μέθοδος μέτρησης της κυτταροτοξικότητας, όταν δεν χρησιμοποιείται κυτταροχαλασίνη Β (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Δείκτης αναδιπλασιασμού (RI): το ποσοστό κυτταρικών κύκλων διαίρεσης που ολοκληρώνονται σε υποβαλλόμενη σε αγωγή καλλιέργεια, σε σχέση με τον μάρτυρα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή, κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης και της αποκατάστασης (βλέπε μαθηματικό τύπο στο προσάρτημα 2).

Ελεγχόμενη χημική ουσία (καλούμενη επίσης «ελεγχόμενη ουσία»): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

▼M3

Προσάρτημα 2

Μαθηματικοί τύποι για την εκτίμηση της κυταροτοξικότητας

1. *Όταν χρησιμοποιείται cytoB*, η κυτταροτοξικότητα πρέπει να εκτιμάται με βάση τον δείκτη πολλαπλασιασμού με αναστολή κυτταροκίνησης (CBPI) ή τον δείκτη αναδιπλασιασμού (RI) (16) (58). Ο CBPI δείχνει τον μέσο αριθμό κυτταρικών κύκλων ανά κύτταρο κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης στην cytoB και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ο RI δείχνει τον σχετικό αριθμό πυρήνων στις υποβαλλόμενες σε αγωγή καλλιέργειες σε σχέση με τις καλλιέργειες-μάρτυρες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του επί τοις εκατό ποσοστού κυτταρόστασης.

$$\text{Κυτταρόσταση } \% = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

και

T = καλλιέργεια που υποβάλλεται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία

C = καλλιέργεια-μάρτυρας με φορέα

όπου:

$$\text{CBPI} = \frac{\begin{array}{c}((\text{αριθ. μονοπύρηνων κυττάρων})+\\(2 \times \text{αριθ. διπύρηνων κυττάρων}) + (3 \times \text{αριθ. πολυπύρηνων κυττάρων}))\end{array}}{(\text{συνολικός αριθ. κυττάρων})}$$

Συνεπώς, μια τιμή CBPI ίση με 1 (όλα τα κύτταρα είναι μονοπύρηνα) ισοδυναμεί με κυτταρόσταση 100 %.

$$\text{Κυτταρόσταση} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{\begin{array}{c}((\text{αριθ. διπύρηνων κυττάρων}) + (2 \times \text{αριθ. πολυπύρηνων κυττάρων})) \div\\(\text{συνολικός αριθ. κυττάρων})_T\end{array}}{((\text{αριθ. διπύρηνων κυττάρων}) + (2 \times \text{αριθ. πολυπύρηνων κυττάρων})) \div (\text{συνολικός αριθ. κυττάρων})_C} \times 100$$

T = υποβαλλόμενες σε αγωγή καλλιέργειες

C = καλλιέργειες-μάρτυρες

2. Συνεπώς, μια τιμή RI ίση με 53 % σημαίνει ότι στην υποβληθείσα σε αγωγή καλλιέργεια διαιρέθηκε μόνο το 53 % του αριθμού των κυττάρων που διαιρέθηκαν στην καλλιέργεια-μάρτυρα προς σχηματισμό διπύρηνων και πολυπύρηνων κυττάρων, δηλαδή κυτταρόσταση 47 %.

3. *Όταν δεν χρησιμοποιείται cytoB*, συνιστάται η εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας με βάση τη σχετική αύξηση του καταμετρούμενου αριθμού κυττάρων (RICC) ή τον σχετικό διπλασιασμό του πληθυσμού (RPD) (58), δεδομένου ότι και στις δύο αυτές παραμέτρους λαμβάνεται υπόψη το διαιρεθέν ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{αύξηση του αριθμού κυττάρων στις καλλιέργειες αγωγής (τελικός – αρχικός)})}{(\text{αύξηση του αριθμού κυττάρων στις καλλιέργειες – μάρτυρες (τελικός – αρχικός)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{αριθ.διπλασιασμών του πληθυσμού στις καλλιέργειες αγωγής})}{(\text{αριθ.διπλασιασμών του πληθυσμού στις καλλιέργειες – μάρτυρες})} \times 100$$

▼**M3**

όπου:

Διπλασιασμός πληθυσμού = [log (αριθ. κυττάρων μετά την αγωγή ÷ αρχικός αριθ. κυττάρων)] ÷ log 2

4. Συνεπώς μια τιμή RICC ή RPD ίση με 53 % δείχνει κυτταροτοξικότητα/κυτταρόσταση 47 %.

5. Η κυτταροτοξικότητα είναι δυνατόν να εκτιμηθεί μέσω της καταμέτρησης των κλώνων που αποτελούνται από 1 (cl1), 2 (cl2), 3 έως 4 (cl4) και 5 έως 8 (cl8) κύτταρα, με τη βοήθεια δείκτη πολλαπλασιασμού (PI).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. Ο PI έχει χρησιμοποιηθεί ως χρήσιμη και αξιόπιστη παράμετρος κυτταροτοξικότητας και στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών που καλλιεργούνται in situ χωρίς cytoB (25) (26) (27) (28).

▼M3

Προσάρτημα 3

Συνιστώμενες χημικές ουσίες αναφοράς για την αξιολόγηση των επιδόσεων [1]

Κατηγορία	Χημική ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EC
1. Κλαστογόνες ουσίες που δρουν χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση			
	Αραβινοζίτης κυτοσίνης	147-94-4	205-705-9
	Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6
2. Κλαστογόνες ουσίες που απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση			
	Βενζο[a]πυρένιο	50-32-8	200-028-5
	Κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0	200-015-4
3. Ανευπλοειδογόνες ουσίες			
	Κολχικίνη	64-86-8	200-598-5
	Βινβλαστίνη	143-67-9	205-606-0
4. Ουσίες αρνητικού αποτελέσματος			
	Φθαλικό δι(2-αιθυλεξύλιο)	117-81-7	204-211-0
	Ναλιδιξικό οξύ	389-08-2	206-864-7
	Πυρένιο	129-00-0	204-927-3
	Χλωριούχο νάτριο	7647-14-5	231-598-3

[1] Χημικές ουσίες αναφοράς είναι εκείνες που συνιστάται να χρησιμοποιούνται. Είναι δυνατή η υποκατάσταση ή προσθήκη ουσιών στον κατάλογο χημικών ουσιών αναφοράς εάν η δραστικότητά τους είναι γνωστή, εάν επάγουν μικροπυρήνες με τους ίδιους μηχανισμούς δράσης και εάν είναι αποδεδειγμένα συναφείς με τις χημικές ουσίες που θα υποβάλλονται σε δοκιμή με τη διαδικασία MNvit. Ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό, η σχετική αιτιολόγηση μπορεί να περιλαμβάνει και μελέτη επικύρωσης στην οποία χρησιμοποιήθηκε ευρύ φάσμα ουσιών ή η οποία επικεντρώθηκε σε στενότερο φάσμα, με βάση τη χημική τάξη της ελεγχόμενης ουσίας ή τον μελετώμενο μηχανισμό πρόκλησης βλάβης.

▼M3

Β.50. ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ: DA

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες και οι μέθοδοι δοκιμών της ΕΕ επανεξετάζονται κατά περιόδους με βάση την επιστημονική πρόοδο, τις μεταβαλλόμενες ανάγκες κανονιστικής ρύθμισης και τον προβληματισμό όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων. Η πρώτη μέθοδος δοκιμών (Β.42) για τον προσδιορισμό της ευαισθητοποίησης του δέρματος σε ποντικούς, δηλαδή η τοπική δοκιμασία λεμφαδένων (LLNA – κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 429) αναθεωρήθηκε (1). Έχουν δημοσιευθεί λεπτομερείς περιγραφές της επικύρωσης της LLNA, καθώς και επισκόπηση των σχετικών εργασιών (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Στην LLNA χρησιμοποιείται ραδιενεργός θυμιδίνη ή ραδιενεργό ιώδιο για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η χρήση της δοκιμασίας όταν υπάρχουν προβλήματα προμήθειας, χρήσης ή τελικής διάθεσης ραδιοϊσοτόπων. Η μέθοδος δοκιμών LLNA: DA (αναπτύχθηκε από την εταιρεία Daicel Chemical Industries, Ltd.) αποτελεί τροποποίηση της LLNA που δεν απαιτεί ραδιενέργεια και στην οποία προσδιορίζεται, μέσω της βιοφωταύγειας, η περιεκτικότητα σε τριφωσφορική αδενοσίνη (αδενοσινοτριφωσφορικό οξύ, ATP) ως δείκτης πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων. Η LLNA: DA επικυρώθηκε, επανεξετάστηκε και συνιστάται από διεθνή επιτροπή αξιολόγησης από ομότιμους κριτές, καθώς θεωρείται χρήσιμη για την αναγνώριση των ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών για το δέρμα χημικών ουσιών, με ορισμένους περιορισμούς (10) (11) (12) (13). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών σχεδιάστηκε για την εκτίμηση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) στα ζώα. Το κεφάλαιο Β.6 του παρόντος παραρτήματος και η κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 συνίστανται σε δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια, συγκεκριμένα στη δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια και τη δοκιμή Buehler (14). Τόσο η LLNA (κεφάλαιο Β.42 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 429), όσο και οι δύο τροποποιήσεις της που δεν απαιτούν ραδιενέργεια – LLNA: DA (κεφάλαιο Β.50 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 A) και LLNA: BrdU-ELISA (κεφάλαιο Β.51 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 B) – προσφέρουν πλεονέκτημα έναντι των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια που περιγράφονται στο κεφάλαιο Β.6 και στην κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 (14), όσον αφορά τον περιορισμό και τη βελτίωση της χρήσης ζώων.

2. Η LLNA: DA, όπως και η LLNA, μελετά την επαγωγική φάση της δερματικής ευαισθητοποίησης και παρέχει κατάλληλα ποσοτικά δεδομένα για την εκτίμηση της σχέσης δόσης-απόκρισης. Επιπλέον, η ικανότητα ανίχνευσης των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών χωρίς να χρειάζεται ραδιοσήμανση για το DNA αποκλείει το ενδεχόμενο επαγγελματικής έκθεσης σε ραδιενέργεια και αίρει τα προβλήματα διάθεσης των αποβλήτων. Αυτό παρέχει τη δυνατότητα αύξησης της χρήσης ποντικών για την ανίχνευση των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών, χάρη στην οποία θα μπορούσε να περιοριστεί περαιτέρω η χρήση ινδικών χοιριδίων σε δοκιμές για τη διαπίστωση του δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης (κεφάλαιο Β.6, OECD Test Guideline 406) (14).

ΟΡΙΣΜΟΙ

3. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η δοκιμασία LLNA: DA αποτελεί τροποποιημένη μέθοδο LLNA για την αναγνώριση χημικών ουσιών που πιθανώς προκαλούν δερματική ευαισθητοποίηση, με συγκεκριμένους περιορισμούς. Αυτό δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι η LLNA: DA πρέπει να χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση αντί της LLNA ή των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο Β.6, OECD Test Guideline 406) (14), αλλά μάλλον ότι είναι εφάμιλλη των τελευταίων και μπορεί να χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση, η οποία κατά κανόνα δεν απαιτεί περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, θετικών και

▼M3

αρνητικών (10) (11). Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών τοξικότητας της ουσίας, in vitro ή in vivo, και τα τοξικολογικά δεδομένα του αφορούν χημικά προϊόντα ανάλογης δομής. Τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη προκειμένου να κριθεί αν η LLNA: DA είναι κατάλληλη για την ελεγχόμενη ουσία (με δεδομένη την ασυμβατότητα περιορισμένου αριθμού ειδών χημικών προϊόντων με την LLNA: DA —βλέπε παράγραφο 5) και ως βοήθημα κατά την επιλογή δόσεων.

5. Η LLNA: DA είναι μέθοδος in vivo και, επομένως, δεν καταργεί τη χρήση ζώων στην εκτίμηση της δραστικότητας αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Είναι ωστόσο ικανή να περιορίσει τη χρήση ζώων για τον σκοπό αυτό, σε σύγκριση με τις δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (14). Επιπλέον, η LLNA: DA βελτιώνει ουσιαστικά (ελάττωση του πόνου και της δυσφορίας) τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται τα ζώα στις δοκιμές αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής, δεδομένου ότι, σε αντίθεση με τη μέθοδο δοκιμών B.6 και την κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406, δεν απαιτεί την εκδήλωση των επαγόμενων από το ερέθισμα αντιδράσεων δερματικής υπερευαισθησίας. Παρά τα πλεονεκτήματα της LLNA: BrdU-DA έναντι των μεθόδων B.6 και OECD Test Guideline 406 (14), υπάρχουν ορισμένοι περιοριστικοί παράγοντες που ενδέχεται να επιβάλλουν τη χρήση των B.6 και OECD Test Guideline 406 (π.χ. δοκιμές με ορισμένα μέταλλα, ψευδοθετικά ευρήματα με ορισμένες ερεθιστικές για το δέρμα ουσίες [όπως ορισμένα επιφανειοδραστικά χημικά προϊόντα] (6) (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος), η διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας). Επιπροσθέτως, η χρήση των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια [μέθοδοι B.6, OECD Test Guideline 406 (14)] ενδέχεται να καταστεί αναγκαία στην περίπτωση χημικών ουσιών ή τάξεων χημικών ουσιών που περιέχουν δραστικές ομάδες οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν συγχυτικούς παράγοντες (16).Οι περιορισμοί που έχουν προσδιοριστεί για την LLNA (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος) συνιστάται να ισχύουν και για την LLNA: BrdU-DA (10). Επιπλέον, η χρήση της LLNA: DA πιθανώς να μην ενδείκνυται για τις δοκιμές με ουσίες που επηρεάζουν τα επίπεδα ATP (π.χ. ουσίες που δρουν ως αναστολείς της ATP) ή την ακριβή μέτρηση της ενδοκυττάριας ATP (π.χ. παρουσία ενζύμων που διασπούν την ATP, παρουσία εξωκυττάριας ATP στον λεμφαδένα). Εκτός αυτών των εντοπισθέντων περιορισμών, θεωρείται ότι η LLNA: DA μπορεί να εφαρμοστεί στις δοκιμές οποιασδήποτε ουσίας, εκτός εάν αυτή έχει ιδιότητες που ενδέχεται να επηρεάσουν την ορθότητα της μεθόδου. Επιπροσθέτως, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα οριακών θετικών αποτελεσμάτων όταν οι τιμές του δείκτη διέγερσης (SI) κυμαίνονται από 1,8 έως 2,5 (βλέπε παραγράφους 31-32). Αυτό στηρίζεται στη βάση δεδομένων επικύρωσης για 44 ουσίες με τη χρήση SI $\geq$ 1,8 (βλέπε παράγραφο 6), από τις οποίες αναγνωρίστηκαν σωστά με την LLNA: DA και οι 32 ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA, αλλά δεν αναγνωρίστηκαν σωστά 3 από τις 12 μη ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA ουσίες με τιμές SI μεταξύ 1,8 και 2,5 (δηλαδή οριακό θετικό αποτέλεσμα) (10). Επειδή, ωστόσο, χρησιμοποιήθηκε η ίδια σειρά δεδομένων για τον καθορισμό των τιμών του SI και για τον υπολογισμό των προγνωστικών ιδιοτήτων της δοκιμής, τα αναφερόμενα αποτελέσματα μπορεί να συνιστούν υπερεκτίμηση των πραγματικών προγνωστικών ιδιοτήτων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

6. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η LLNA: DA είναι ότι οι ευαισθητοποιητικές ουσίες επάγουν πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Ο πολλαπλασιασμός αυτός είναι ανάλογος με τη δόση και με την ισχύ του εφαρμοζόμενου αλλεργιογόνου και αποτελεί ένα απλό μέσο αντικειμενικής, ποσοτικής μέτρησης της ευαισθητοποίησης. Μετράται με σύγκριση του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα δοκιμής προς τον αριθμητικό μέσο του πολλαπλασιασμού στην ομάδα-μάρτυρα που έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον φορέα (VC). Προσδιορίζεται ο λόγος του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα που

▼M3

υποβάλλεται σε αγωγή προς την αντίστοιχη τιμή για την παράλληλη ομάδα VC, ο οποίος καλείται δείκτης διέγερσης (SI) και πρέπει να είναι ≥ 1,8 ώστε να δικαιολογείται η περαιτέρω αξιολόγηση μιας ελεγχόμενης ουσίας ως δυνητικά ευαισθητοποιητικής για το δέρμα. Οι διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο βασίζονται στη μέτρηση της περιεκτικότητας σε ATP μέσω της βιοφωταύγειας (που είναι γνωστό ότι συσχετίζεται με τον αριθμό ζωντανών κυττάρων) (17) ως ένδειξης αυξημένου αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στους αποχετευτικούς ωτικούς λεμφαδένες (18) (19). Στη μέθοδο βιοφωταύγειας χρησιμοποιείται το ένζυμο λουσιφεράση για να καταλύσει την εκπομπή φωτός κατά την ακόλουθη αντίδραση ATP με λουσιφερίνη:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Light$$

Η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός συνδέεται με γραμμική σχέση με τη συγκέντρωση ATP και μετράται με ειδικό φωτόμετρο φωταυγειομετρίας (λουμινόμετρο). Η δοκιμασία λουσιφερίνης-λουσιφεράσης αποτελεί ευαίσθητη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού της ATP με ευρύ φάσμα εφαρμογών (20).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Επιλογή ζωικού είδους

7. Το είδος που έχει επιλεγεί για τη συγκεκριμένη δοκιμή είναι ο ποντικός. Οι μελέτες επικύρωσης της LLNA: DA διεξήχθησαν αποκλειστικά σε ποντικούς της φυλής CBA/J, η οποία κατά συνέπεια θεωρείται προτιμώμενη (12) (13). Χρησιμοποιούνται νεαροί ενήλικες θηλυκοί ποντικοί που δεν έχουν ποτέ γεννήσει ούτε εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της μελέτης, η ηλικία των ζώων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και οι διαφορές βάρους μεταξύ τους πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το 20 % της μέσης τιμής. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η χρήση άλλων φυλών, καθώς και αρσενικών ζώων, εφόσον έχουν συγκεντρωθεί επαρκή δεδομένα από τα οποία προκύπτει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές απόκρισης κατά την LLNA: DA, οφειλόμενες ειδικά στη φυλή και/ή το φύλο.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

8. Οι ποντικοί πρέπει να στεγάζονται σε ομάδες (21), εκτός εάν η ατομική στέγασή τους δικαιολογείται με επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εντούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12ώρου. Για τη διατροφή επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

Προετοιμασία των ζώων

9. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός (αλλά όχι με αναγνωριστικό ενώτιο οποιασδήποτε μορφής) και παραμένουν στους κλωβούς τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες. Πριν από την έναρξη της αγωγής, εξετάζονται όλα τα ζώα για να είναι βέβαιο ότι δεν παρουσιάζουν εμφανείς βλάβες του δέρματος.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοσολογίας

10. Πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού, τα στερεά χημικά προϊόντα πρέπει να διαλύονται, ή να σχηματίζεται εναιώρημά τους, σε κατάλληλους διαλύτες/φορείς και να αραιώνονται, εφόσον ενδείκνυται. Τα υγρά χημικά προϊόντα μπορούν να εφαρμόζονται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Τα αδιάλυτα χημικά προϊόντα, όπως αυτά που συναντώνται συνήθως στα ιατροτεχνολογικά είδη, πρέπει να υποβάλλονται σε εξαντλητική εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη, ώστε να παραλαμβάνονται όλα τα εκχυλίσιμα συστατικά για δοκιμή, πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού. Τα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

▼M3

Έλεγχος αξιοπιστίας

11. Χρησιμοποιούνται χημικά προϊόντα ως θετικοί μάρτυρες για να καταδειχθεί η ορθή εκτέλεση της δοκιμασίας με την απόκριση, με επαρκή και αναπαραγώγιμη ευαισθησία, σε ευαισθητοποιητική ελεγχόμενη ουσία για την οποία έχει χαρακτηριστεί επακριβώς το μέγεθος της απόκρισης. Συνιστάται η συμπερίληψη παράλληλου θετικού μάρτυρα επειδή καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να εκτελεί με επιτυχία κάθε δοκιμασία και καθιστά δυνατή την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και συγκρισιμότητας. Επίσης, καθώς ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη χρήση θετικού μάρτυρα σε κάθε μελέτη, συνιστάται στους χρήστες να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών πριν από τη διεξαγωγή της LLNA: DA. Συνιστάται, επομένως, η χρήση παράλληλου θετικού μάρτυρα ως συνήθης πρακτική, ώστε να μην χρειάζονται πρόσθετες δοκιμές σε ζώα για την κάλυψη των αναγκών που μπορεί να δημιουργήσει η περιοδική χρήση θετικών μαρτύρων (βλέπε παράγραφο 12). Ένας θετικός μάρτυρας θα πρέπει να δίδει θετική απόκριση κατά την LLNA: DA σε επίπεδα έκθεσης τα οποία αναμένεται να προκαλέσουν αύξηση του SI σε τιμή ≥ 1,8 σε σύγκριση με την ομάδα αρνητικού μάρτυρα. Η δόση για τον θετικό μάρτυρα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να μην προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος ή συστημική τοξικότητα και η επαγωγή να είναι αναπαραγώγιμη αλλά όχι υπερβολική (δηλαδή οι τιμές SI > 10 θεωρούνται υπέρμετρες). Οι προτιμώμενοι θετικοί μάρτυρες είναι το διάλυμα εξυλοκινναμωμικής αλδεΰδης (αριθ. Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) 25 % και το διάλυμα ευγενόλης (αριθ. CAS 97-53-0) 25 % σε μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v). Σε ορισμένες, δεόντως αιτιολογημένες, περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλοι θετικοί μάρτυρες που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια.

12. Παρά τη σύσταση για συμπερίληψη παράλληλης ομάδας θετικού μάρτυρα, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να αρκεί η περιοδική δοκιμή του θετικού μάρτυρα (δηλαδή ανά διαστήματα που δεν υπερβαίνουν το εξάμηνο) για εργαστήρια που εκτελούν τακτικά LLNA: DA (δηλαδή με συχνότητα τουλάχιστον μηνιαία) και διαθέτουν εδραιωμένη ιστορική βάση δεδομένων για τον θετικό μάρτυρα, η οποία καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να επιτυγχάνει αναπαραγώγιμα και ορθά αποτελέσματα με τους θετικούς μάρτυρες. Η επαρκής τεχνική ικανότητα ως προς την LLNA: DA μπορεί να αποδειχθεί με την επίτευξη σταθερών θετικών αποτελεσμάτων με τον θετικό μάρτυρα σε 10 τουλάχιστον ανεξάρτητες δοκιμές που έχουν διεξαχθεί εντός εύλογου χρονικού διαστήματος, δηλαδή μικρότερου από ένα έτος.

13. Πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πάντοτε παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα όταν επέρχονται διαδικαστικές αλλαγές στην LLNA: DA (π.χ. αλλαγή ειδικευμένου προσωπικού, αλλαγή υλικών και/ή αντιδραστηρίων της μεθόδου δοκιμών ή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται σε αυτή, αλλαγή της προέλευσης των πειραματόζωων), οι οποίες πρέπει να τεκμηριώνονται στις εκθέσεις του εργαστηρίου. Πρέπει να εξετάζονται οι επιπτώσεις των αλλαγών αυτών στην επάρκεια της ήδη συγκροτημένης ιστορικής βάσης δεδομένων, προκειμένου να κριθεί αν είναι απαραίτητη η δημιουργία νέας ιστορικής βάσης δεδομένων για την τεκμηρίωση της σταθερότητας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν με τους θετικούς μάρτυρες.

14. Οι ερευνητές θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η απόφαση για διεξαγωγή περιοδικής και όχι ταυτόχρονης μελέτης με θετικό μάρτυρα επηρεάζει έμμεσα την επάρκεια και τη δυνατότητα αποδοχής των αρνητικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν χωρίς παράλληλο θετικό μάρτυρα κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ των περιοδικών μελετών με θετικό μάρτυρα. Για παράδειγμα, σε περίπτωση ψευδαρνητικού αποτελέσματος της περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα, μπορεί να αμφισβητηθούν τα αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν για την ελεγχόμενη ουσία κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ της τελευταίας αποδεκτής περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα και της μη αποδεκτής. Οι συνέπειες αυτές πρέπει να λαμβάνονται επιμελώς υπόψη όταν κρίνεται αν θα συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ή θα διεξάγονται απλώς περιοδικές μελέτες με θετικούς μάρτυρες. Πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερου αριθμού ζώων στην παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα, εφόσον δικαιολογείται από επιστημονική άποψη και το εργαστήριο καταδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης μικρότερου αριθμού ποντικών με βάση ειδικά για το ίδιο ιστορικά δεδομένα (22).

▼M3

15. Παρόλο που ο θετικός μάρτυρας πρέπει να ελέγχεται στον φορέα που είναι γνωστό ότι αποσπά σταθερή απόκριση (π.χ. μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου σε αναλογία 4:1, v/v), ενδέχεται να υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι νομοθετικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τη διεξαγωγή δοκιμών και σε μη τυποποιημένο φορέα (κλινικώς/χημικώς συναφές σκεύασμα) (23). Σε περίπτωση δοκιμής του παράλληλου θετικού μάρτυρα και της ελεγχόμενης ουσίας σε διαφορετικούς φορείς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται χωριστός μάρτυρας VC για τον παράλληλο θετικό μάρτυρα.

16. Όταν αξιολογούνται ουσίες που ανήκουν σε συγκεκριμένη τάξη χημικών ουσιών ή προκαλούν συγκεκριμένο φάσμα αποκρίσεων, είναι ενδεχομένως χρήσιμες και οι ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης για να καταδειχθεί η ορθή λειτουργία της μεθόδου δοκιμών ως προς την ανίχνευση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των συγκεκριμένων ειδών ουσιών. Οι κατάλληλες ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες:

— δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη της ελεγχόμενης ουσίας,

— γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που προέρχονται από την LLNA: DA,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που αφορούν άλλα ζωικά μοντέλα και/ή τον άνθρωπο.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αριθμός ζώων και επίπεδα δόσεων

17. Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα, με τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, συν μια παράλληλη ομάδα αρνητικού μάρτυρα, που υποβάλλεται σε αγωγή μόνο με τον φορέα της ελεγχόμενης ουσίας, και έναν θετικό μάρτυρα (παράλληλο ή πρόσφατο, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15). Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο δοκιμής με πολλαπλές δόσεις της ουσίας που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας, κυρίως στις περιπτώσεις διαλειπουσών δοκιμών με θετικό μάρτυρα. Η μεταχείριση και η αγωγή των ζώων των ομάδων-μαρτύρων, εκτός του ότι αυτά δεν υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει κατά τα άλλα να είναι πανομοιότυπες με των ζώων των ομάδων αγωγής.

18. Η επιλογή των δόσεων και του φορέα πρέπει να βασίζεται στις συστάσεις των βιβλιογραφικών πηγών (2) και (24). Επιλέγονται κατά κανόνα διαδοχικές δόσεις από κατάλληλη σειρά συγκεντρώσεων, όπως 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % κ.λπ. Η επιλογή της χρησιμοποιούμενης σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να συνοδεύεται από επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Κατά την επιλογή των τριών διαδοχικών συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα υπάρχοντα τοξικολογικά στοιχεία (π.χ. οξεία τοξικότητα και δερματικός ερεθισμός) και στοιχεία για τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας (και/ή ουσιών ανάλογης δομής) που ενδιαφέρουν, έτσι ώστε η υψηλότερη συγκέντρωση να μεγιστοποιεί την έκθεση, χωρίς να προκαλεί συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (24) (25). Εάν δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία, μπορεί να χρειάζεται δοκιμή προδιαλογής (βλέπε παραγράφους 21-24).

19. Ο φορέας πρέπει να μην προκαλεί συστηματικά και άλλα σφάλματα στα αποτελέσματα των δοκιμών και να επιλέγεται με γνώμονα τη μεγιστοποίηση της διαλυτότητας, ώστε να προκύπτει η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση και, ταυτόχρονα, να σχηματίζεται κατάλληλο διάλυμα/εναιώρημα για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας. Συνιστώνται οι ακόλουθοι φορείς: μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο, μεθυλαιθυλκετόνη, προπυλενογλυκόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (6), χωρίς να αποκλείεται η χρήση άλλων, εφόσον παρέχεται επαρκής επιστημονική αιτιολόγηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται η χρήση, ως πρόσθετου μάρτυρα, ενός κλινικώς συναφούς διαλύτη ή του σκευάσματος του εμπορίου με τη μορφή του οποίου διατίθεται στην αγορά η ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την ενσωμάτωση των υδρόφιλων ουσιών σε ένα σύστημα φορέα το οποίο διαβρέχει το δέρμα και δεν απορρέει αμέσως, με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτοποιητών (π.χ. 1 % Pluronic® L92). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να αποφεύγονται οι εξ ολοκλήρου υδατικοί φορείς.

▼M3

20. Η επεξεργασία λεμφαδένων μεμονωμένων ποντικών επιτρέπει την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων και τη στατιστική ανάλυση της διαφοράς μεταξύ των μετρήσεων της ελεγχόμενης ουσίας και των μετρήσεων της ομάδας VC (βλέπε παράγραφο 33) Επιπλέον, η αξιολόγηση της δυνατότητας μείωσης του αριθμού ποντικών της ομάδας θετικού μάρτυρα είναι εφικτή μόνο εφόσον συλλέγονται δεδομένα για μεμονωμένα ζώα (22). Επίσης, ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα. Η τακτική συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα προσφέρει ένα πλεονέκτημα από πλευράς καλής μεταχείρισης των ζώων, καθώς αποτρέπει την επανάληψη δοκιμών που θα ήταν αναγκαία σε περίπτωση μεταγενέστερης εξέτασης των αποτελεσμάτων τα οποία έχουν προκύψει για την ελεγχόμενη ουσία με έναν τρόπο (π.χ. από συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα) από ρυθμιστικές αρχές που έχουν άλλες απαιτήσεις (π.χ. δεδομένα για μεμονωμένα ζώα).

Δοκιμή προδιαλογής

21. Όταν δεν υπάρχουν στοιχεία για τον προσδιορισμό της μέγιστης δόσης προς δοκιμή (βλέπε παράγραφο 18), θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή προδιαλογής, προκειμένου να καθοριστεί το κατάλληλο επίπεδο δόσης για τη δοκιμή με LLNA: DA. Η δοκιμή προδιαλογής αποσκοπεί στην καθοδήγηση κατά την επιλογή του ανώτατου επιπέδου δόσης το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-DA, στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη συγκέντρωση η οποία επάγει συστημική τοξικότητα (βλέπε παράγραφο 24) και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (βλέπε παράγραφο 23). Το ανώτατο επίπεδο δόσης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή πρέπει να είναι το 100 % της ελεγχόμενης ουσίας, εάν αυτή είναι υγρή, ή η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση, προκειμένου για στερεά ή εναιωρήματα.

22. Η δοκιμή προδιαλογής διεξάγεται στις ίδιες συνθήκες όπως η κυρίως μελέτη LLNA: DA, εκτός από την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού στους λεμφαδένες, η οποία παραλείπεται, και τη δυνατότητα μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε κάθε δοσολογική ομάδα. Προτείνεται η χρήση ενός ή δύο ζώων ανά δοσολογική ομάδα. Όλοι οι ποντικοί εξετάζονται καθημερινά για την ανίχνευση κλινικών σημείων συστημικής τοξικότητας ή τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Καταγράφεται το βάρος σώματος πριν από την έναρξη και πριν από τον τερματισμό της δοκιμής (8η ημέρα). Εξετάζονται και τα δύο αυτιά κάθε ποντικού για την ανίχνευση ερυθήματος, το οποίο βαθμολογείται με τη βοήθεια του πίνακα 1 (25). Μετράται το πάχος των αυτιών με παχύμετρο (π.χ. ψηφιακό μικρόμετρο ή παχύμετρο Peacock Dial) την 1η ημέρα (πριν από τη χορήγηση της δόσης), την 3η ημέρα (περίπου 48 ώρες μετά την πρώτη δόση), την 7η ημέρα (24 ώρες πριν από τον τερματισμό) και την 8η ημέρα. Επιπλέον, το πάχος των αυτιών είναι δυνατόν να προσδιοριστεί την 8η ημέρα με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας, οι οποίοι πρέπει να εκτελούνται μετά τη θανάτωση των ζώων με ευθανασία. Μια βαθμολογία ερυθήματος ≥ 3 και/ή η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά ≥ 25 %, σε οποιαδήποτε ημέρα μέτρησης, αποτελούν ενδείξεις υπέρμετρου τοπικού ερεθισμού (26) (27). Ως μέγιστη δόση για την κυρίως μελέτη LLNA: DA επιλέγεται η αμέσως χαμηλότερη δόση στη σειρά συγκεντρώσεων της προδιαλογής (βλέπε παράγραφο 18) η οποία δεν επάγει συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος.

Πίνακας 1

Βαθμολογία ερυθήματος

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Απουσία ερυθήματος	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2

▼M3

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα τεύτλων) έως σχηματισμός εσχάρας που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθήματος	4

23. Εκτός από την αύξηση του πάχους των αυτιών κατά 25 % (26) (27), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των ερεθιστικών ουσιών κατά την LLNA η στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους των αυτιών των ποντικών που υποβάλλονται σε αγωγή σε σύγκριση με τους ποντικούς-μάρτυρες (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ωστόσο, η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά λιγότερο από 25 %, έστω και αν είναι στατιστικά σημαντική, δεν έχει συσχετιστεί ειδικά με υπέρμετρο ερεθισμό (30) (31) (32) (33) (34).

24. Οι ακόλουθες κλινικές παρατηρήσεις, εντασσόμενες σε ολοκληρωμένη εκτίμηση, είναι δυνατόν να αποτελούν ένδειξη συστημικής τοξικότητας (35) και, κατ' επέκταση, να υποδεικνύουν το ανώτατο επίπεδο δόσης προς χρήση στην κυρίως μελέτη LLNA: DA: αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος (π.χ. ανόρθωση τριχών, αταξία, τρόμοι, σπασμοί), στη συμπεριφορά (π.χ. επιθετικότητα, αλλαγή όσον αφορά την περιποίηση του σώματος, έντονη μεταβολή της κινητικότητας), στον αναπνευστικό ρυθμό (δηλαδή μεταβολές της συχνότητας και της έντασης των αναπνοών, όπως δύσπνοια, ασθμαίνουσα αναπνοή και ρόγχος), καθώς και στην κατανάλωση τροφής και νερού. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση τα σημεία λήθαργου και/ή απουσίας αντίδρασης σε ερεθίσματα και κάθε κλινικό σημείο που υπερβαίνει τον ελαφρό ή στιγμιαίο πόνο και δυσφορία, η μείωση του βάρους σώματος κατά > 5 % μεταξύ 1ης και 8ης ημέρας και η θνησιμότητα. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και όσα παρουσιάζουν σημεία έντονου πόνου και δυσφορίας, πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (36).

Πρόγραμμα πειραμάτων της κυρίως μελέτης

25. Το πρόγραμμα πειραμάτων της δοκιμασίας έχει ως εξής:

— *1η ημέρα:* Κάθε ζώο ζυγίζεται χωριστά και καταγράφονται το βάρος του και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Η ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού επιχρίεται με υδατικό διάλυμα λαυρυλοθειικού νατρίου (SLS) 1 % με τη βοήθεια ψήκτρας εμβαπτιζόμενης στο διάλυμα αυτό, έτσι ώστε να καλύπτεται ολόκληρη η ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού με 4-5 κινήσεις. Μία ώρα μετά την αγωγή με SLS, τοποθετούνται στη ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού 25 μL κατάλληλης αραίωσης της ελεγχόμενης ουσίας, του φορέα μόνου ή του θετικού μάρτυρα (παράλληλου ή πρόσφατου, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15).

— *2η, 3η και 7η ημέρα:* Επαναλαμβάνεται η διαδικασία προκατεργασίας με υδατικό διάλυμα SLS 1 % και εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας όπως την 1η ημέρα.

— *4η, 5η και 6η ημέρα:* Καμία αγωγή.

— *8η ημέρα:* Καταγράφονται το βάρος κάθε ζώου και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Περίπου 24 έως 30 ώρες μετά την έναρξη της εφαρμογής κατά την 7η ημέρα, τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία. Εκτέμνονται οι αποχετευτικοί ωτικοί λεμφαδένες από κάθε αυτί ποντικού και υποβάλλονται χωριστά σε επεξεργασία με φυσιολογικό ορό στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS) ανά ζώο. Λεπτομέρειες και διαγράμματα για την αναγνώριση και την εκτομή των λεμφαδένων παρέχονται στη βιβλιογραφική πηγή (22). Για την περαιτέρω παρακολούθηση της τοπικής απόκρισης του δέρματος κατά την κυρίως μελέτη, το πρωτόκολλό της μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετες παραμέτρους, όπως βαθμολογία του ωτικού ερυθήματος ή μετρήσεις του πάχους των αυτιών (με τη βοήθεια παχυμέτρου ή με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας κατά τη νεκροψία).

▼M3

Παρασκευή κυτταρικών εναιωρημάτων

26. Παρασκευάζεται εναιώρημα μεμονωμένων λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες που έχουν ληφθεί με αμφοτερόπλευρη εκτομή από κάθε ποντικό, με την τοποθέτηση των λεμφαδένων μεταξύ δύο γυάλινων πλακιδίων και την άσκηση ελαφράς πίεσης ώστε να συνθλιβούν οι αδένες. Αφού επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός λεπτού ομοιόμορφου στρώματος του ιστού, διαχωρίζονται τα δύο πλακίδια. Σχηματίζεται εναιώρημα του ιστού και των δύο πλακιδίων σε PBS ως εξής: κάθε πλακίδιο κρατείται υπό κλίση πάνω από το τρυβλίο Petri και εκπλύνεται με PBS, ενώ ταυτόχρονα αφαιρείται ο ιστός από το πλακίδιο με ξέστρο κυττάρων. Εξάλλου, επειδή οι λεμφαδένες των ζώων της ομάδας αρνητικού μάρτυρα είναι μικροί, είναι σημαντικό να εκτελείται η εργασία αυτή με προσοχή ώστε να αποφεύγονται οι τεχνητές επιδράσεις στις τιμές του SI. Για την έκπλυση των δύο πλακιδίων πρέπει να χρησιμοποιείται συνολικός όγκος 1 mL PBS. Το εναιώρημα λεμφοκυττάρων στο τρυβλίο Petri πρέπει να ομοιογενοποιείται ελαφρά με το ξέστρο κυττάρων. Στη συνέχεια, λαμβάνεται με μικροσιφώνιο ποσότητα 20 μL του εναιωρήματος λεμφοκυττάρων —με προσοχή ώστε να μην αναρροφηθεί η ορατή μεμβράνη— και αναμειγνύεται με 1,98 mL PBS για να προκύψει δείγμα όγκου 2 mL. Παρασκευάζεται έπειτα ένα δεύτερο δείγμα 2 mL με την ίδια διαδικασία, ώστε να αντιστοιχούν δύο δείγματα σε κάθε ζώο.

Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (μέτρηση της περιεκτικότητας των λεμφοκυττάρων σε ATP)

27. Η αύξηση της περιεκτικότητας των λεμφοκυττάρων σε ATP μετράται με τη μέθοδο της λουσιφερίνης/λουσιφεράσης με τη βοήθεια συνόλου αντιδραστηρίων (kit) για τη μέτρηση ATP, το οποίο προσδιορίζει τη βιοφωταύγεια σε σχετικές μονάδες φωταύγειας (RLU). Η διάρκεια της δοκιμασίας, από τον χρόνο θανάτωσης των ζώων μέχρι τη μέτρηση της περιεκτικότητας σε ATP για το καθένα, πρέπει να διατηρείται σταθερή και να μην υπερβαίνει τα 30 λεπτά περίπου, καθώς θεωρείται ότι η περιεκτικότητα σε ATP μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου μετά τη θανάτωση των ζώων (12). Συνεπώς, η σειρά διαδικασιών που αρχίζει με την εκτομή των ωτικών λεμφαδένων και τελειώνει με τη μέτρηση της ATP πρέπει να ολοκληρώνεται εντός 20 λεπτών σύμφωνα με το προκαθορισμένο χρονοδιάγραμμα, που είναι το ίδιο για όλα τα ζώα. Μετράται η φωταύγεια ATP καθενός από τα δείγματα των 2 mL ώστε να λαμβάνονται συνολικά δύο μετρούμενες τιμές ATP για κάθε ζώο. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η μέση τιμή φωταύγειας λόγω ATP, η οποία χρησιμοποιείται στους μετέπειτα υπολογισμούς (βλέπε παράγραφο 30).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Κλινικές παρατηρήσεις

28. Κάθε ποντικός πρέπει να εξετάζεται με προσοχή, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, για την ανίχνευση κλινικών σημείων είτε τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας είτε συστημικής τοξικότητας. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ποντικό. Τα σχέδια παρακολούθησης πρέπει να περιλαμβάνουν κριτήρια για τον ταχύ εντοπισμό, με σκοπό την ευθανασία, των ποντικών που εμφανίζουν συστημική τοξικότητα ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση του δέρματος (36).

Βάρος σώματος

29. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 25, το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετράται κατά την έναρξη της δοκιμής και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

30. Τα αποτελέσματα για κάθε ομάδα αγωγής εκφράζονται σε μέση τιμή SI. Ο SI προκύπτει με διαίρεση της μέσης τιμής RLU/ποντικό κάθε ομάδας αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία, όπως επίσης και της ομάδας θετικού μάρτυρα, διά της μέσης τιμής RLU/ποντικό της ομάδας που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/ομάδας VC. Στην περίπτωση αυτή, ο μέσος SI για τις ομάδες VC ισούται με τη μονάδα.

▼M3

31. Στη διαδικασία λήψης απόφασης, ένα αποτέλεσμα θεωρείται θετικό όταν SI ≥ 1,8 (10). Ωστόσο, όταν κρίνεται αν ένα οριακό αποτέλεσμα (δηλαδή τιμή SI από 1,8 έως 2,5) θα χαρακτηριστεί ή όχι θετικό, μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται η ισχύς της σχέσης δόσης-απόκρισης, η στατιστική σημαντικότητα και η σταθερότητα των αποκρίσεων των μαρτύρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα και των θετικών μαρτύρων (2) (3) (37).

32. Προκειμένου να επιβεβαιώσουν οι χρήστες ότι μια οριακή θετική απόκριση με SI από 1,8 έως 2,5 αποτελεί θετικό αποτέλεσμα, μπορεί να επιθυμούν να λάβουν υπόψη τις τιμές του SI σε συνδυασμό με συμπληρωματικές πληροφορίες, όπως η σχέση δόσης-απόκρισης, τα στοιχεία συστημικής τοξικότητας ή υπέρμετρου ερεθισμού και, εφόσον ενδείκνυται, η στατιστική σημαντικότητα (10). Θα πρέπει επίσης να συνεκτιμώνται διάφορες ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, μεταξύ των οποίων το κατά πόσον έχει δομική σχέση με γνωστές ευαισθητοποιητικές για το δέρμα ουσίες, το κατά πόσον προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος του ποντικού και το είδος της σχέσης δόσης-απόκρισης που παρατηρήθηκε. Αυτά και άλλα κριτήρια αναλύονται στη βιβλιογραφική πηγή (4).

33. Η συλλογή δεδομένων σε επίπεδο μεμονωμένου ποντικού καθιστά δυνατή τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων για τη διαπίστωση της ύπαρξης σχέσης δόσης-απόκρισης και του βαθμού της σχέσης αυτής. Η ενδεχόμενη στατιστική εκτίμηση θα μπορούσε να περιλαμβάνει αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης, καθώς και κατάλληλα προσαρμοσμένες συγκρίσεις των ομάδων δοκιμής (π.χ. συγκρίσεις κατά ζεύγη μεταξύ της ομάδας που λαμβάνει τη δόση και της παράλληλης ομάδας-μάρτυρα που λαμβάνει τον διαλύτη/φορέα). Οι στατιστικές αναλύσεις είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν, λόγου χάριν, γραμμική παλινδρόμηση ή δοκιμή William για την εκτίμηση των τάσεων της απόκρισης σε σχέση με τη δόση και δοκιμή Dunnett για τις συγκρίσεις κατά ζεύγη. Κατά την επιλογή της ενδεδειγμένης μεθόδου στατιστικής ανάλυσης, ο ερευνητής θα πρέπει να έχει επίγνωση των πιθανώς άνισων διακυμάνσεων (διασπορών) και άλλων συναφών προβλημάτων τα οποία ενδέχεται να επιβάλλουν μετασχηματισμό των δεδομένων ή μη παραμετρική στατιστική ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, ενδέχεται να χρειαστεί να εκτελέσει ο ερευνητής υπολογισμούς του SI και στατιστικές αναλύσεις με και χωρίς ορισμένα σημεία δεδομένων (καλούμενα μερικές φορές «έκτροπες τιμές»).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Δεδομένα

34. Τα δεδομένα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα, στον οποίο εμφαίνονται η τιμή RLU για κάθε ζώο, η ομαδική μέση τιμή RLU/ζώο, η σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα-μάρτυρα που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα.

Έκθεση δοκιμής

35. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία και μάρτυρες:

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS και EC, εφόσον υπάρχουν, πηγή, καθαρότητα, γνωστές προσμίξεις, αριθμός παρτίδας),

— σύσταση και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. πτητικότητα, σταθερότητα, διαλυτότητα),

— προκειμένου για μείγματα, σύνθεση και εκατοστιαία αναλογία των συστατικών.

Διαλύτης/φορέας:

— στοιχεία ταυτότητας (καθαρότητα, συγκέντρωση, κατά περίπτωση, όγκος που χρησιμοποιήθηκε),

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

▼M3

Ζώα της δοκιμής:

— προέλευση των ποντικών της φυλής CBA,

— μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή,

— αριθμός και ηλικία των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

— προέλευση, αριθμός παρτίδας και δεδομένα του κατασκευαστή για τον ποιοτικό έλεγχο/διασφάλιση ποιότητας του συνόλου αντιδραστηρίων (kit) για ATP,

— λεπτομέρειες για την παρασκευή και εφαρμογή του δείγματος της ελεγχόμενης ουσίας,

— αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της δοκιμής προδιαλογής, εφόσον έχει διεξαχθεί),

— συγκεντρώσεις φορέα και ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν και συνολική ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας που χορηγήθηκε,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού),

— λεπτομέρειες για τα προγράμματα αγωγής και δειγματοληψίας,

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας,

— κριτήρια χαρακτηρισμού της μελέτης ως θετικής ή αρνητικής,

— λεπτομέρειες για τυχόν παρεκκλίσεις από το πρωτόκολλο και επεξήγηση του τρόπου με τον οποίο αυτές επηρεάζουν τον σχεδιασμό και τα αποτελέσματα της μελέτης.

Έλεγχος αξιοπιστίας:

— περίληψη των αποτελεσμάτων του πιο πρόσφατου ελέγχου αξιοπιστίας, συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, τη συγκέντρωση και τον φορέα που χρησιμοποιήθηκε,

— δεδομένα του εργαστηρίου δοκιμών που αφορούν τον παράλληλο και/ή ιστορικό θετικό μάρτυρα και τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα (αγωγή με τον διαλύτη/φορέα),

— εάν δεν συμπεριελήφθη στη δοκιμή παράλληλος θετικός μάρτυρας, ημερομηνία διεξαγωγής της πιο πρόσφατης περιοδικής δοκιμής με θετικό μάρτυρα και σχετική έκθεση του εργαστηρίου, καθώς και έκθεση με λεπτομερή ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τον θετικό μάρτυρα που δικαιολογούν την απόφαση να μη συμπεριληφθεί παράλληλος θετικός μάρτυρας.

Αποτελέσματα:

— βάρος κάθε ποντικού κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο θανάτωσης, καθώς και μέση τιμή και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) για κάθε ομάδα αγωγής,

— για κάθε ζώο, χρόνος εκδήλωσης και εξέλιξη των σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου τυχόν ερεθισμού του δέρματος στο σημείο χορήγησης,

— για κάθε ζώο, χρόνος θανάτωσης και χρόνος μέτρησης της ATP,

— πίνακας με τις τιμές RLU ανά ποντικό και τις τιμές SI για κάθε δοσολογική ομάδα αγωγής,

— για κάθε ομάδα αγωγής, μέση τιμή RLU/ποντικό και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM), καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης έκτροπων τιμών,

▼M3

— υπολογισμένος SI και κατάλληλο μέτρο μεταβλητότητας στο οποίο συνεκτιμάται η μεταβλητότητα μεταξύ των ζώων, τόσο της ομάδας που υποβάλλεται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, όσο και των ομάδων-μαρτύρων,

— σχέση δόσης-απόκρισης,

— στατιστικές αναλύσεις, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

— σύντομος σχολιασμός των αποτελεσμάτων, της ανάλυσης της σχέσης δόσης-απόκρισης και, κατά περίπτωση, των στατιστικών αναλύσεων, με γνωμάτευση για τον χαρακτηρισμό ή μη της ελεγχόμενης ουσίας ως ευαισθητοποιητικής για το δέρμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd, based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-PRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (38).

Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: ουσία, ευαισθητοποιητική ή μη, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή(-ές) και αξιόπιστη(-ες) προέλευση(-εις), ii) δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη των ελεγχόμενων ουσιών, iii) γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά, iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και (v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Ψευδαρνητικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ουσίας ως αρνητικής ή μη δραστικής με μέθοδο δοκιμών, ενώ στην πραγματικότητα είναι θετική ή δραστική.

Ψευδοθετικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ουσίας ως θετικής ή δραστικής με δοκιμή, ενώ στην πραγματικότητα είναι αρνητική ή μη δραστική.

Κίνδυνος: το δυναμικό δυσμενούς επίδρασης στην υγεία ή στο περιβάλλον. Η δυσμενής επίδραση εκδηλώνεται μόνο εάν τα επίπεδα έκθεσης είναι επαρκή.

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια μπορούν να επιτυγχάνουν ποιοτικά και ποσοτικά παραπλήσια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο και υποβάλλοντας σε δοκιμή τις ίδιες ελεγχόμενες ουσίες. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων» (38).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα εντός του εργαστηρίου» (38).

Έκτροπη τιμή: έκτροπη τιμή (outlier) είναι μια παρατήρηση σε τυχαίο δείγμα πληθυσμού η οποία διαφέρει σημαντικά από άλλες τιμές αυτού του δείγματος.

Διασφάλιση ποιότητας: διαχειριστική διαδικασία με την οποία αξιολογούνται, από άτομα ανεξάρτητα από εκείνα που εκτελούν τις δοκιμές, η τήρηση των προτύπων, των απαιτήσεων και των διαδικασιών τήρησης αρχείων που αφορούν τις εργαστηριακές δοκιμές, καθώς και η ορθότητα της μεταφοράς δεδομένων.

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (38).

Δερματική ευαισθητοποίηση: ανοσολογική διαδικασία που είναι αποτέλεσμα της τοπικής έκθεσης ευπαθούς ατόμου σε επαγωγικό χημικό αλλεργιογόνο, το οποίο προκαλεί δερματική ανοσοαπόκριση που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευαισθητοποίησης εξ επαφής.

Δείκτης διέγερσης (SI): αριθμητική τιμή η οποία υπολογίζεται προκειμένου να εκτιμηθεί το δερματικό ευαισθητοποιητικό δυναμικό μιας ελεγχόμενης ουσίας και ισούται με την αναλογία του πολλαπλασιασμού στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή με την ουσία προς τον πολλαπλασιασμό στην ομάδα-μάρτυρα που υποβάλλεται ταυτόχρονα σε αγωγή με τον φορέα.

Ελεγχόμενη ουσία (καλούμενη επίσης «ελεγχόμενη χημική ουσία»): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

▼M3

B.51. ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΤΟΠΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ: BRDU-ELISA

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες και οι μέθοδοι δοκιμών της ΕΕ επανεξετάζονται κατά περιόδους με βάση την επιστημονική πρόοδο, τις μεταβαλλόμενες ανάγκες κανονιστικής ρύθμισης και τον προβληματισμό όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων. Η πρώτη μέθοδος δοκιμών (Β.42) για τον προσδιορισμό της ευαισθητοποίησης του δέρματος σε ποντικούς, δηλαδή η τοπική δοκιμασία λεμφαδένων (LLNA – κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 429) αναθεωρήθηκε (1 και κεφάλαιο Β.42 του παρόντος παραρτήματος). Έχουν δημοσιευθεί λεπτομερείς περιγραφές της επικύρωσης της LLNA, καθώς και επισκόπηση των σχετικών εργασιών (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Στην LLNA χρησιμοποιείται ραδιενεργός θυμιδίνη ή ραδιενεργό ιώδιο για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η χρήση της δοκιμασίας όταν υπάρχουν προβλήματα προμήθειας, χρήσης ή τελικής διάθεσης ραδιοϊσοτόπων. Η μέθοδος LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay/δοκιμασία ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού] αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου δοκιμών LLNA που δεν απαιτεί ραδιενέργεια και στην οποία χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων μη ραδιοσημασμένη 5-βρωμο-2-δεσοξυουριδίνη (BrdU) (αριθ. Chemical Abstracts Service [CAS] 59-14-3) σε ένα σύστημα δοκιμής βασισμένο στην τεχνική ELISA. Η LLNA: BrdU-ELISA επικυρώθηκε, επανεξετάστηκε και συνιστάται από διεθνή ανεξάρτητη επιστημονική επιτροπή αξιολόγησης από ομότιμους κριτές, καθώς θεωρείται χρήσιμη για την αναγνώριση των ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών για το δέρμα χημικών ουσιών, με ορισμένους περιορισμούς (10) (11) (12). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών σχεδιάστηκε για την εκτίμηση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) στα ζώα. Το κεφάλαιο Β.6 του παρόντος παραρτήματος και η κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 συνίστανται σε δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια, συγκεκριμένα στη δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια και τη δοκιμή Buehler (13). Τόσο η LLNA (κεφάλαιο Β.42 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 429), όσο και οι δύο τροποποιήσεις της που δεν απαιτούν ραδιενέργεια – LLNA: BrdU-ELISA (κεφάλαιο Β.51 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 B) και LLNA: DA (κεφάλαιο Β.50 του παρόντος παραρτήματος, OECD Test Guideline 442 A) – προσφέρουν πλεονέκτημα έναντι των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια που περιγράφονται στο κεφάλαιο Β.6 και στην κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406 (13) όσον αφορά τον περιορισμό και τη βελτίωση της χρήσης ζώων.

2. Η LLNA: BrdU-ELISA, όπως και η LLNA, μελετά την επαγωγική φάση της δερματικής ευαισθητοποίησης και παρέχει κατάλληλα ποσοτικά δεδομένα για την εκτίμηση της σχέσης δόσης-απόκρισης. Επιπλέον, η ικανότητα ανίχνευσης των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών χωρίς να χρειάζεται ραδιοσήμανση για το DNA αποκλείει το ενδεχόμενο επαγγελματικής έκθεσης σε ραδιενέργεια και αίρει τα προβλήματα διάθεσης των αποβλήτων. Αυτό παρέχει τη δυνατότητα αύξησης της χρήσης ποντικών για την ανίχνευση των ευαισθητοποιητικών για το δέρμα ουσιών, χάρη στην οποία θα μπορούσε να περιοριστεί περαιτέρω η χρήση ινδικών χοιριδίων σε δοκιμές για τη διαπίστωση του δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης (κεφάλαιο Β.6, OECD Test Guideline 406) (13).

ΟΡΙΣΜΟΙ

3. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η LLNA: BrdU-ELISA αποτελεί τροποποιημένη μέθοδο LLNA για την αναγνώριση χημικών ουσιών που πιθανώς προκαλούν δερματική ευαισθητοποίηση, με συγκεκριμένους περιορισμούς. Αυτό δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι η LLNA: BrdU-ELISA πρέπει να χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση αντί της LLNA ή των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο Β.6, OECD Test Guideline 406) (13) αλλά μάλλον ότι είναι εφάμιλλη των τελευταίων και μπορεί να χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση, η οποία κατά κανόνα δεν απαιτεί περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων,

▼M3

θετικών και αρνητικών (10) (11). Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, μεταξύ των οποίων την ταυτότητα και τη χημική δομή της, τις φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα τυχόν άλλων δοκιμών τοξικότητας της ουσίας, in vitro ή in vivo, και τα τοξικολογικά δεδομένα του αφορούν χημικά προϊόντα ανάλογης δομής. Τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη προκειμένου να κριθεί αν η LLNA: BrdU-ELISA είναι κατάλληλη για την ελεγχόμενη ουσία (με δεδομένη την ασυμβατότητα περιορισμένου αριθμού ειδών χημικών προϊόντων με την LLNA: BrdU-ELISA —βλέπε παράγραφο 5) και ως βοήθημα κατά την επιλογή δόσεων.

5. Η LLNA: BrdU-ELISA είναι μέθοδος in vivo και, επομένως, δεν καταργεί τη χρήση ζώων στην εκτίμηση της δραστικότητας αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής. Είναι ωστόσο ικανή να περιορίσει τη χρήση ζώων για τον σκοπό αυτό, σε σύγκριση με τις δοκιμές σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6, OECD Test Guideline 406) (13). Επιπλέον, η LLNA: BrdU-ELISA βελτιώνει ουσιαστικά τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται τα ζώα στις δοκιμές αλλεργικής ευαισθητοποίησης εξ επαφής, δεδομένου ότι, σε αντίθεση με τη μέθοδο δοκιμών B.6 και την κατευθυντήρια γραμμή OECD Test Guideline 406, δεν απαιτεί την εκδήλωση των επαγόμενων από το ερέθισμα αντιδράσεων δερματικής υπερευαισθησίας. Επίσης, η LLNA: BrdU-ELISA δεν απαιτεί τη χρήση ανοσοενισχυτικών, όπως η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια (κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος, 13). Κατ' αυτόν τον τρόπο, η LLNA: BrdU-ELISA περιορίζει τη δυσφορία των ζώων. Παρά τα πλεονεκτήματα της LLNA: BrdU-ELISA έναντι των μεθόδων B.6 και OECD Test Guideline 406 (13), υπάρχουν ορισμένοι περιοριστικοί παράγοντες που ενδέχεται να επιβάλλουν τη χρήση των B.6 και OECD Test Guideline 406 (π.χ. δοκιμές με ορισμένα μέταλλα, ψευδοθετικά ευρήματα με ορισμένες ερεθιστικές για το δέρμα ουσίες [όπως ορισμένα επιφανειοδραστικά χημικά προϊόντα] (6) (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος), η διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας). Επιπροσθέτως, η χρήση των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδοι B.6, OECD Test Guideline 406) (13) ενδέχεται να καταστεί αναγκαία στην περίπτωση χημικών ουσιών ή τάξεων χημικών ουσιών που περιέχουν δραστικές ομάδες οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν συγχυτικούς παράγοντες (15). Οι περιορισμοί που έχουν προσδιοριστεί για την LLNA (1 και κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος) συνιστάται να ισχύουν και για την LLNA: BrdU-ELISA (10). Εκτός αυτών των εντοπισθέντων περιορισμών, θεωρείται ότι η LLNA: BrdU-ELISA μπορεί να εφαρμοστεί στις δοκιμές οποιασδήποτε χημικής ουσίας, εκτός εάν αυτή έχει ιδιότητες που ενδέχεται να επηρεάσουν την ορθότητα της μεθόδου. Επιπροσθέτως, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα οριακών θετικών αποτελεσμάτων όταν οι τιμές του δείκτη διέγερσης (SI) κυμαίνονται από 1,6 έως 1,9 (βλέπε παραγράφους 31-32). Αυτό στηρίζεται στη βάση δεδομένων επικύρωσης για 43 ουσίες με τη χρήση SI ≥ 1,6 (βλέπε παράγραφο 6), από τις οποίες αναγνωρίστηκαν σωστά με την LLNA: BrdU-ELISA και οι 32 ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA, αλλά δεν αναγνωρίστηκαν σωστά 2 από τις 11 μη ευαισθητοποιητικές βάσει της LLNA ουσίες με τιμές SI μεταξύ 1,6 και 1,9 (δηλαδή οριακό θετικό αποτέλεσμα) (10). Επειδή, ωστόσο, χρησιμοποιήθηκε η ίδια σειρά δεδομένων για τον καθορισμό των τιμών του SI και για τον υπολογισμό των προγνωστικών ιδιοτήτων της δοκιμής, τα αναφερόμενα αποτελέσματα μπορεί να συνιστούν υπερεκτίμηση των πραγματικών προγνωστικών ιδιοτήτων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

6. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η LLNA: BrdU-ELISA είναι ότι οι ευαισθητοποιητικές ουσίες επάγουν πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων που αποχετεύουν το σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Ο πολλαπλασιασμός αυτός είναι ανάλογος με τη δόση και με την ισχύ του εφαρμοζόμενου αλλεργιογόνου και αποτελεί ένα απλό μέσο αντικειμενικής, ποσοτικής μέτρησης της ευαισθητοποίησης. Μετράται με σύγκριση του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα δοκιμής προς τον αριθμητικό μέσο του πολλαπλασιασμού στην ομάδα-μάρτυρα που έχει υποβληθεί σε αγωγή με τον φορέα (VC). Προσδιορίζεται ο λόγος του αριθμητικού μέσου του πολλαπλασιασμού σε κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε αγωγή προς την αντίστοιχη τιμή για την παράλληλη ομάδα VC, ο οποίος καλείται δείκτης διέγερσης (SI) και πρέπει να είναι ≥ 1,6 ώστε να δικαιολογείται η περαιτέρω αξιολόγηση μιας ελεγχόμενης ουσίας

▼M3

ως δυνητικά ευαισθητοποιητικής για το δέρμα. Οι διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο βασίζονται στη χρήση της μετρούμενης περιεκτικότητας σε BrdU ως ένδειξης αυξημένου αριθμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στους αποχετευτικούς ωτικούς λεμφαδένες. Η BrdU είναι ένωση ομοειδής με τη θυμιδίνη και ενσωματώνεται με παρόμοιο τρόπο στο DNA των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Η ενσωμάτωση της BrdU μετράται με την τεχνική ELISA, στην οποία χρησιμοποιείται ένα εξειδικευμένο αντίσωμα για τη BrdU, σημασμένο με υπεροξειδάση. Με την προσθήκη του υποστρώματος, η υπεροξειδάση αντιδρά με αυτό προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μέσω της ειδικής απορρόφησης, με τη χρήση συσκευής ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Επιλογή ζωικού είδους

7. Το είδος που έχει επιλεγεί για τη συγκεκριμένη δοκιμή είναι ο ποντικός. Οι μελέτες επικύρωσης της LLNA: BrdU-ELISA διεξήχθησαν αποκλειστικά σε ποντικούς της φυλής CBA/J, η οποία κατά συνέπεια θεωρείται προτιμώμενη (10) (12). Χρησιμοποιούνται νεαροί ενήλικες θηλυκοί ποντικοί που δεν έχουν ποτέ γεννήσει ούτε εγκυμονούν. Κατά την έναρξη της μελέτης, η ηλικία των ζώων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων και οι διαφορές βάρους μεταξύ τους πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το 20 % της μέσης τιμής. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η χρήση άλλων φυλών, καθώς και αρσενικών ζώων, εφόσον έχουν συγκεντρωθεί επαρκή δεδομένα από τα οποία προκύπτει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές απόκρισης κατά την LLNA: BrdU-ELISA, οφειλόμενες ειδικά στη φυλή και/ή το φύλο.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

8. Οι ποντικοί πρέπει να στεγάζονται σε ομάδες (16), εκτός εάν η ατομική στέγασή τους δικαιολογείται με επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Αν και η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εντούτοις ο στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12ώρου. Για τη διατροφή επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού.

Προετοιμασία των ζώων

9. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός (αλλά όχι με αναγνωριστικό ενώτιο οποιασδήποτε μορφής) και παραμένουν στους κλωβούς τους τουλάχιστον για πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων, ώστε να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες. Πριν από την έναρξη της αγωγής, εξετάζονται όλα τα ζώα για να είναι βέβαιο ότι δεν παρουσιάζουν εμφανείς βλάβες του δέρματος.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοσολογίας

10. Πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού, τα στερεά χημικά προϊόντα πρέπει να διαλύονται, ή να σχηματίζεται εναιώρημά τους, σε κατάλληλους διαλύτες/φορείς και να αραιώνονται, εφόσον ενδείκνυται. Τα υγρά χημικά προϊόντα μπορούν να εφαρμόζονται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Τα αδιάλυτα χημικά προϊόντα, όπως αυτά που συναντώνται συνήθως στα ιατροτεχνολογικά είδη, πρέπει να υποβάλλονται σε εξαντλητική εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη, ώστε να παραλαμβάνονται όλα τα εκχυλίσιμα συστατικά για δοκιμή, πριν από την εφαρμογή στο αυτί ποντικού. Τα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να ανανεώνονται καθημερινά, εκτός εάν η φύλαξή τους είναι αποδεκτή βάσει των σχετικών με τη σταθερότητα στοιχείων.

Έλεγχος αξιοπιστίας

11. Χρησιμοποιούνται χημικά προϊόντα ως θετικοί μάρτυρες για να καταδειχθεί η ορθή εκτέλεση της δοκιμασίας με την απόκριση, με επαρκή και αναπαραγώγιμη ευαισθησία, σε ευαισθητοποιητική ελεγχόμενη ουσία για την οποία έχει χαρακτηριστεί επακριβώς το μέγεθος της απόκρισης. Συνιστάται η συμπερίληψη παράλληλου θετικού μάρτυρα επειδή καταδεικνύει την

▼M3

ικανότητα του εργαστηρίου να εκτελεί με επιτυχία κάθε δοκιμασία και καθιστά δυνατή την εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και συγκρισιμότητας. Επίσης, καθώς ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη χρήση θετικού μάρτυρα σε κάθε μελέτη, συνιστάται στους χρήστες να ζητούν τη γνώμη των αρμόδιων αρχών πριν από τη διεξαγωγή της LLNA: BrdU-ELISA. Συνιστάται, επομένως, η χρήση παράλληλου θετικού μάρτυρα ως συνήθης πρακτική, ώστε να μην χρειάζονται πρόσθετες δοκιμές σε ζώα για την κάλυψη των αναγκών που μπορεί να δημιουργήσει η περιοδική χρήση θετικών μαρτύρων (βλέπε παράγραφο 12). Ένας θετικός μάρτυρας θα πρέπει να δίδει θετική απόκριση κατά την LLNA: BrdU-ELISA σε επίπεδα έκθεσης τα οποία αναμένεται να προκαλέσουν αύξηση του SI σε τιμή ≥ 1,6 σε σύγκριση με την ομάδα αρνητικού μάρτυρα. Η δόση για τον θετικό μάρτυρα πρέπει να επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να μην προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος ή συστημική τοξικότητα και η επαγωγή να είναι αναπαραγώγιμη αλλά όχι υπερβολική (δηλαδή οι τιμές SI > 14 θεωρούνται υπέρμετρες). Οι προτιμώμενοι θετικοί μάρτυρες είναι το διάλυμα εξυλοκινναμωμικής αλδεΰδης (αριθ. CAS 101-86-0) 25 % και το διάλυμα ευγενόλης (αριθ. CAS 97-53-0) 25 % σε μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v). Σε ορισμένες, δεόντως αιτιολογημένες περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλοι θετικοί μάρτυρες που πληρούν τα προαναφερόμενα κριτήρια.

12. Παρά τη σύσταση για συμπερίληψη παράλληλης ομάδας θετικού μάρτυρα, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να αρκεί η περιοδική δοκιμή του θετικού μάρτυρα (δηλαδή ανά διαστήματα που δεν υπερβαίνουν το εξάμηνο) για εργαστήρια που εκτελούν τακτικά LLNA: BrdU-ELISA (δηλαδή με συχνότητα τουλάχιστον μηνιαία) και διαθέτουν εδραιωμένη ιστορική βάση δεδομένων για τον θετικό μάρτυρα, η οποία καταδεικνύει την ικανότητα του εργαστηρίου να επιτυγχάνει αναπαραγώγιμα και ορθά αποτελέσματα με τους θετικούς μάρτυρες. Η επαρκής τεχνική ικανότητα ως προς την LLNA: BrdU-ELISA μπορεί να αποδειχθεί με την επίτευξη σταθερών θετικών αποτελεσμάτων με τον θετικό μάρτυρα σε 10 τουλάχιστον ανεξάρτητες δοκιμές που έχουν διεξαχθεί εντός εύλογου χρονικού διαστήματος, δηλαδή μικρότερου από ένα έτος.

13. Πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πάντοτε παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα όταν επέρχονται διαδικαστικές αλλαγές στην LLNA: BrdU-ELISA (π.χ. αλλαγή ειδικευμένου προσωπικού, αλλαγή υλικών και/ή αντιδραστηρίων της μεθόδου δοκιμών ή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται σε αυτή, αλλαγή της προέλευσης των πειραματόζωων), οι οποίες πρέπει να τεκμηριώνονται στις εκθέσεις του εργαστηρίου. Πρέπει να εξετάζονται οι επιπτώσεις των αλλαγών αυτών στην επάρκεια της ήδη συγκροτημένης ιστορικής βάσης δεδομένων, προκειμένου να κριθεί αν είναι απαραίτητη η δημιουργία νέας ιστορικής βάσης δεδομένων για την τεκμηρίωση της σταθερότητας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν με τους θετικούς μάρτυρες.

14. Οι ερευνητές θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η απόφαση για διεξαγωγή περιοδικής και όχι ταυτόχρονης μελέτης με θετικό μάρτυρα επηρεάζει έμμεσα την επάρκεια και τη δυνατότητα αποδοχής των αρνητικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν χωρίς παράλληλο θετικό μάρτυρα κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ των περιοδικών μελετών με θετικό μάρτυρα. Για παράδειγμα, σε περίπτωση ψευδαρνητικού αποτελέσματος της περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα, μπορεί να αμφισβητηθούν τα αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν για την ελεγχόμενη ουσία κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ της τελευταίας αποδεκτής περιοδικής μελέτης με θετικό μάρτυρα και της μη αποδεκτής. Οι συνέπειες αυτές πρέπει να λαμβάνονται επιμελώς υπόψη όταν κρίνεται αν θα συμπεριλαμβάνονται παράλληλοι θετικοί μάρτυρες ή θα διεξάγονται απλώς περιοδικές μελέτες με θετικούς μάρτυρες. Πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερου αριθμού ζώων στην παράλληλη ομάδα θετικού μάρτυρα, εφόσον δικαιολογείται από επιστημονική άποψη και το εργαστήριο καταδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης μικρότερου αριθμού ποντικών με βάση ειδικά για το ίδιο ιστορικά δεδομένα (17).

15. Παρόλο που ο θετικός μάρτυρας πρέπει να ελέγχεται στον φορέα που είναι γνωστό ότι αποσπά σταθερή απόκριση (π.χ. μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου σε αναλογία 4:1, v/v), ενδέχεται να υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι νομοθετικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τη διεξαγωγή δοκιμών και σε μη τυποποιημένο φορέα (κλινικώς/χημικώς συναφές σκεύασμα) (18). Σε περίπτωση δοκιμής του παράλληλου θετικού μάρτυρα και της ελεγχόμενης ουσίας σε διαφορετικούς φορείς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται χωριστός μάρτυρας VC για τον παράλληλο θετικό μάρτυρα.

▼M3

16. Όταν αξιολογούνται ελεγχόμενες ουσίες που ανήκουν σε συγκεκριμένη τάξη χημικών ουσιών ή προκαλούν συγκεκριμένο φάσμα αποκρίσεων, είναι ενδεχομένως χρήσιμες και οι ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης για να καταδειχθεί η ορθή λειτουργία της μεθόδου ως προς την ανίχνευση του δερματικού ευαισθητοποιητικού δυναμικού των συγκεκριμένων ειδών ελεγχόμενων ουσιών. Οι κατάλληλες ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες:

— δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη της ελεγχόμενης ουσίας,

— γνωστά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που προέρχονται από την LLNA: BrdU-ELISA,

— δεδομένα τεκμηρίωσης που αφορούν άλλα ζωικά μοντέλα και/ή τον άνθρωπο.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αριθμός ζώων και επίπεδα δόσεων

17. Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερα ζώα ανά δοσολογική ομάδα, με τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, συν μια παράλληλη ομάδα αρνητικού μάρτυρα, που υποβάλλεται σε αγωγή μόνο με τον φορέα της ελεγχόμενης ουσίας, και μια ομάδα θετικού μάρτυρα (παράλληλου ή πρόσφατου, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15). Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο δοκιμής με πολλαπλές δόσεις της ουσίας που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας, κυρίως στις περιπτώσεις διαλειπουσών δοκιμών με θετικό μάρτυρα. Η μεταχείριση και η αγωγή των ζώων των ομάδων-μαρτύρων, εκτός του ότι αυτά δεν υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει κατά τα άλλα να είναι πανομοιότυπες με των ζώων των ομάδων αγωγής.

18. Η επιλογή των δόσεων και του φορέα πρέπει να βασίζεται στις συστάσεις των βιβλιογραφικών πηγών (2) και (19). Επιλέγονται κατά κανόνα διαδοχικές δόσεις από κατάλληλη σειρά συγκεντρώσεων, όπως 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % κ.λπ. Η επιλογή της χρησιμοποιούμενης σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να συνοδεύεται από επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση. Κατά την επιλογή των τριών διαδοχικών συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα υπάρχοντα τοξικολογικά στοιχεία (π.χ. οξεία τοξικότητα και δερματικός ερεθισμός) και στοιχεία για τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας (και/ή ουσιών ανάλογης δομής) που ενδιαφέρουν, έτσι ώστε η υψηλότερη συγκέντρωση να μεγιστοποιεί την έκθεση, χωρίς να προκαλεί συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (19) (20) και κεφάλαιο Β.4 του παρόντος παραρτήματος). Εάν δεν υπάρχουν τέτοια στοιχεία, μπορεί να χρειάζεται δοκιμή προδιαλογής (βλέπε παραγράφους 21-24).

19. Ο φορέας πρέπει να μην προκαλεί συστηματικά και άλλα σφάλματα στα αποτελέσματα των δοκιμών και να επιλέγεται με γνώμονα τη μεγιστοποίηση της διαλυτότητας, ώστε να προκύπτει η μέγιστη εφικτή συγκέντρωση και, ταυτόχρονα, να σχηματίζεται κατάλληλο διάλυμα/εναιώρημα για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας. Συνιστώνται οι ακόλουθοι φορείς: μείγμα ακετόνης-ελαιολάδου (4:1, v/v), N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο, μεθυλαιθυλκετόνη, προπυλενογλυκόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (6), χωρίς να αποκλείεται η χρήση άλλων, εφόσον παρέχεται επαρκής επιστημονική αιτιολόγηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται η χρήση, ως πρόσθετου μάρτυρα, ενός κλινικώς συναφούς διαλύτη ή του σκευάσματος του εμπορίου με τη μορφή του οποίου διατίθεται στην αγορά η ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την ενσωμάτωση των υδρόφιλων ελεγχόμενων ουσιών σε ένα σύστημα φορέα το οποίο διαβρέχει το δέρμα και δεν απορρέει αμέσως, με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτοποιητών (π.χ. 1 % Pluronic® L92). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να αποφεύγονται οι εξ ολοκλήρου υδατικοί φορείς.

▼M3

20. Η επεξεργασία λεμφαδένων μεμονωμένων ποντικών επιτρέπει την εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ των ζώων και τη στατιστική ανάλυση της διαφοράς μεταξύ των μετρήσεων της ελεγχόμενης ουσίας και των μετρήσεων της ομάδας VC (βλέπε παράγραφο 33) Επιπλέον, η αξιολόγηση της δυνατότητας μείωσης του αριθμού ποντικών της ομάδας θετικού μάρτυρα είναι εφικτή μόνο εφόσον συλλέγονται δεδομένα για μεμονωμένα ζώα (17). Επίσης, ορισμένες ρυθμιστικές Αρχές απαιτούν τη συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα. Η τακτική συλλογή δεδομένων για μεμονωμένα ζώα προσφέρει ένα πλεονέκτημα από πλευράς καλής μεταχείρισης των ζώων, καθώς αποτρέπει την επανάληψη δοκιμών που θα ήταν αναγκαία σε περίπτωση μεταγενέστερης εξέτασης των αποτελεσμάτων τα οποία έχουν προκύψει για την ελεγχόμενη ουσία με έναν τρόπο (π.χ. από συγχωνευμένα δεδομένα για τα ζώα) από ρυθμιστικές αρχές που έχουν άλλες απαιτήσεις (π.χ. δεδομένα για μεμονωμένα ζώα).

Δοκιμή προδιαλογής

21. Όταν δεν υπάρχουν στοιχεία για τον προσδιορισμό της μέγιστης δόσης προς δοκιμή (βλέπε παράγραφο 18), θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή προδιαλογής, προκειμένου να καθοριστεί το κατάλληλο επίπεδο δόσης για τη δοκιμή με LLNA: BrdU-ELISA. Η δοκιμή προδιαλογής αποσκοπεί στην καθοδήγηση κατά την επιλογή του ανώτατου επιπέδου δόσης το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA, στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη συγκέντρωση η οποία επάγει συστημική τοξικότητα (βλέπε παράγραφο 24) και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος (βλέπε παράγραφο 23). Το ανώτατο επίπεδο δόσης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή πρέπει να είναι η συγκέντρωση 100 % της ελεγχόμενης ουσίας, εάν αυτή είναι υγρή, ή η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση, προκειμένου για στερεά ή εναιωρήματα.

22. Η δοκιμή προδιαλογής διεξάγεται στις ίδιες συνθήκες όπως η κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA, εκτός από την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού στους λεμφαδένες, η οποία παραλείπεται, και τη δυνατότητα μείωσης του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε κάθε δοσολογική ομάδα. Προτείνεται η χρήση ενός ή δύο ζώων ανά δοσολογική ομάδα. Όλοι οι ποντικοί εξετάζονται καθημερινά για την ανίχνευση κλινικών σημείων συστημικής τοξικότητας ή τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας. Καταγράφεται το βάρος σώματος πριν από την έναρξη και πριν από τον τερματισμό της δοκιμής (6η ημέρα). Εξετάζονται και τα δύο αυτιά κάθε ποντικού για την ανίχνευση ερυθήματος, το οποίο βαθμολογείται με τη βοήθεια του πίνακα 1 (20 και κεφάλαιο B.4 του παρόντος παραρτήματος). Μετράται το πάχος των αυτιών με παχύμετρο (π.χ. ψηφιακό μικρόμετρο ή παχύμετρο Peacock Dial) την 1η ημέρα (πριν από τη χορήγηση της δόσης), την 3η ημέρα (περίπου 48 ώρες μετά την πρώτη δόση) και την 6η ημέρα. Επιπλέον, το πάχος των αυτιών είναι δυνατόν να προσδιοριστεί την 6η ημέρα με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας, οι οποίοι πρέπει να εκτελούνται μετά τη θανάτωση των ζώων με ευθανασία. Μια βαθμολογία ερυθήματος ≥ 3 και/ή η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά ≥ 25 %, σε οποιαδήποτε ημέρα μέτρησης, αποτελούν ενδείξεις υπέρμετρου τοπικού ερεθισμού (21) (22). Ως μέγιστη δόση για την κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA επιλέγεται η αμέσως χαμηλότερη δόση στη σειρά συγκεντρώσεων της προδιαλογής (βλέπε παράγραφο 18) η οποία δεν επάγει συστημική τοξικότητα και/ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό του δέρματος.

Πίνακας 1

Βαθμολογία ερυθήματος

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Απουσία ερυθήματος	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις αντιληπτό)	1
Περιγεγραμμένο ερύθημα	2

▼M3

Παρατήρηση	Βαθμολογία
Μέτριο έως σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (ερυθρότητα τεύτλων) έως σχηματισμός εσχάρας που εμποδίζει τη διαβάθμιση του ερυθήματος	4

23. Εκτός από την αύξηση του πάχους των αυτιών κατά 25 % (21) (22), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των ερεθιστικών ουσιών κατά την LLNA η στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους των αυτιών των ποντικών που υποβάλλονται σε αγωγή σε σύγκριση με τους ποντικούς-μάρτυρες (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Ωστόσο, η αύξηση του πάχους των αυτιών κατά λιγότερο από 25 %, έστω και αν είναι στατιστικά σημαντική, δεν έχει συσχετιστεί ειδικά με υπέρμετρο ερεθισμό (25) (26) (27) (28) (29).

24. Οι ακόλουθες κλινικές παρατηρήσεις, εντασσόμενες σε ολοκληρωμένη εκτίμηση, είναι δυνατόν να αποτελούν ένδειξη συστημικής τοξικότητας (30) και, κατ' επέκταση, να υποδεικνύουν το ανώτατο επίπεδο δόσης προς χρήση στην κυρίως μελέτη LLNA: BrdU-ELISA αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος (π.χ. ανόρθωση τριχών, αταξία, τρόμοι, σπασμοί), στη συμπεριφορά (π.χ. επιθετικότητα, αλλαγή όσον αφορά την περιποίηση του σώματος, έντονη μεταβολή της κινητικότητας), στον αναπνευστικό ρυθμό (δηλαδή μεταβολές της συχνότητας και της έντασης των αναπνοών, όπως δύσπνοια, ασθμαίνουσα αναπνοή και ρόγχος), καθώς και στην κατανάλωση τροφής και νερού. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση τα σημεία λήθαργου και/ή απουσίας αντίδρασης σε ερεθίσματα και κάθε κλινικό σημείο που υπερβαίνει τον ελαφρό ή στιγμιαίο πόνο και δυσφορία, η μείωση του βάρους σώματος κατά > 5 % μεταξύ 1ης και 6ης ημέρας και η θνησιμότητα. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και όσα παρουσιάζουν σημεία έντονου πόνου και δυσφορίας, πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (31).

Πρόγραμμα πειραμάτων της κυρίως μελέτης

25. Το πρόγραμμα πειραμάτων της δοκιμασίας έχει ως εξής:

— *1η ημέρα:* Κάθε ζώο ζυγίζεται χωριστά και καταγράφονται το βάρος του και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Στη ραχιαία επιφάνεια κάθε αυτιού τοποθετούνται 25 μL κατάλληλης αραίωσης της ελεγχόμενης ουσίας, του φορέα μόνου ή του θετικού μάρτυρα (παράλληλου ή πρόσφατου, ανάλογα με την πολιτική που εφαρμόζει το εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τις παραγράφους 11-15).

— *2η και 3η ημέρα:* Επαναλαμβάνεται η διαδικασία εφαρμογής της ουσίας όπως την πρώτη ημέρα.

— *4η ημέρα:* Καμία αγωγή.

— *5η ημέρα:* Χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκώς 0,5 mL (5 mg/ποντικό) διαλύματος BrdU (10 mg/mL).

— *6η ημέρα:* Καταγράφονται το βάρος κάθε ζώου και οι ενδεχόμενες κλινικές παρατηρήσεις. Περίπου 24 ώρες μετά τη χορήγηση της BrdU, τα ζώα θανατώνονται με ευθανασία. Εκτέμνονται οι αποχετευτικοί ωτικοί λεμφαδένες από κάθε αυτί ποντικού και υποβάλλονται χωριστά σε επεξεργασία με φυσιολογικό ορό στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS) ανά ζώο. Λεπτομέρειες και διαγράμματα για την αναγνώριση και την εκτομή των λεμφαδένων παρέχονται στη βιβλιογραφική πηγή (17). Για την περαιτέρω παρακολούθηση της τοπικής απόκρισης του δέρματος κατά την κυρίως μελέτη, το πρωτόκολλό της μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετες παραμέτρους, όπως βαθμολογία του ωτικού ερυθήματος ή μετρήσεις του πάχους των αυτιών (με τη βοήθεια παχυμέτρου ή με προσδιορισμούς βάρους δείγματος αυτιού λαμβανόμενου με λαβίδα βιοψίας κατά τη νεκροψία).

▼M3

Παρασκευή κυτταρικών εναιωρημάτων

26. Παρασκευάζεται εναιώρημα μεμονωμένων λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες που έχουν ληφθεί με αμφοτερόπλευρη εκτομή από κάθε ποντικό, με ήπια μηχανική διάσπαση μέσω πλέγματος από ανοξείδωτο χάλυβα με οπές των 200 μm ή με άλλη αποδεκτή τεχνική σχηματισμού εναιωρήματος μεμονωμένων κυττάρων (π.χ. σύνθλιψη των λεμφαδένων με τη βοήθεια πλαστικού υπέρου ιγδίου (γουδοχέρι) μιας χρήσης, ακολουθούμενη από διήθηση μέσω δικτυωτού πλέγματος από νάιλον των 70 μm). Δεδομένου ότι η διαδικασία παρασκευής του εναιωρήματος λεμφοκυττάρων είναι κρίσιμης σημασίας για την παρούσα δοκιμασία, κάθε χειριστής θα πρέπει να έχει αποκτήσει εκ των προτέρων τη σχετική δεξιότητα. Εξάλλου, επειδή οι λεμφαδένες των ζώων της ομάδας αρνητικού μάρτυρα είναι μικροί, είναι σημαντικό να εκτελείται η εργασία αυτή με προσοχή ώστε να αποφεύγονται οι τεχνητές επιδράσεις στις τιμές του SI. Σε κάθε περίπτωση, ο στοχευόμενος όγκος του εναιωρήματος λεμφοκυττάρων πρέπει να ρυθμίζεται σε βελτιστοποιημένο όγκο (περίπου 15 mL), ο οποίος προσδιορίζεται με γνώμονα την επίτευξη μέσης τιμής απορρόφησης 0,1-0,2 στην ομάδα αρνητικού μάρτυρα.

Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (μέτρηση της περιεκτικότητας του DNA των λεμφοκυττάρων σε BrdU)

27. Η περιεκτικότητα σε BrdU μετράται με την τεχνική ELISA, με τη χρήση ενός συνόλου αντιδραστηρίων του εμπορίου (π.χ. Roche Applied Science, Mannheim, Γερμανία, αριθ. καταλόγου 11 647 229 001). Περιληπτικά, φέρονται 100 μL εναιωρήματος λεμφοκυττάρων, εις τριπλούν, στις κοιλότητες (μικροκυψελίδες) πλάκας μικροτιτλοδότησης με επίπεδο πυθμένα. Μετά από μονιμοποίηση και αποδιάταξη των λεμφοκυττάρων, προστίθεται σε κάθε κοιλότητα αντίσωμα anti-BrdU και αφήνεται να αντιδράσει. Στη συνέχεια απομακρύνεται το αντίσωμα anti-BrdU με έκπλυση και προστίθεται το διάλυμα υποστρώματος για να παραχθεί το χρωμογόνο. Μετράται έπειτα η απορρόφηση στα 370 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 492 nm. Σε όλες τις περιπτώσεις πρέπει να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες δοκιμής (βλέπε παράγραφο 26).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Κλινικές παρατηρήσεις

28. Κάθε ποντικός πρέπει να εξετάζεται με προσοχή, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, για την ανίχνευση κλινικών σημείων είτε τοπικού ερεθισμού στο σημείο εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας είτε συστημικής τοξικότητας. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά σε χωριστό αρχείο για κάθε ποντικό. Τα σχέδια παρακολούθησης πρέπει να περιλαμβάνουν κριτήρια για τον ταχύ εντοπισμό, με σκοπό την ευθανασία, των ποντικών που εμφανίζουν συστημική τοξικότητα ή υπέρμετρο τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση του δέρματος (31).

Βάρος σώματος

29. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 25, το βάρος κάθε ζώου πρέπει να μετράται κατά την έναρξη της δοκιμής και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

30. Τα αποτελέσματα για κάθε ομάδα αγωγής εκφράζονται σε μέση τιμή SI. Ο SI προκύπτει με διαίρεση της μέσης τιμής του δείκτη σήμανσης BrdU/ποντικό κάθε ομάδας αγωγής με την ελεγχόμενη ουσία, όπως επίσης και της ομάδας θετικού μάρτυρα, διά της μέσης τιμής του δείκτη σήμανσης BrdU/ποντικό της ομάδας που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/ομάδας VC. Στην περίπτωση αυτή, ο μέσος SI για τις ομάδες VC ισούται με τη μονάδα.

Ο δείκτης σήμανσης BrdU ορίζεται ως εξής:

$$\text{Δείκτης σήμανσης BrdU} = (\text{ABS}_{em} - \text{ABS τυφλού}_{em}) - (\text{ABS}_{ref} - \text{ABS τυφλού}_{ref})$$

όπου: em = μήκος κύματος εκπομπής και ref = μήκος κύματος αναφοράς.

▼M3

31. Στη διαδικασία λήψης απόφασης, ένα αποτέλεσμα θεωρείται θετικό όταν SI ≥ 1,6 (10). Ωστόσο, όταν κρίνεται αν ένα οριακό αποτέλεσμα (δηλαδή τιμή SI από 1,6 έως 1,9) θα χαρακτηριστεί ή όχι θετικό, μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται η ισχύς της σχέσης δόσης-απόκρισης, η στατιστική σημαντικότητα και η σταθερότητα των αποκρίσεων των μαρτύρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα και των θετικών μαρτύρων (3) (6) (32).

32. Προκειμένου να επιβεβαιώσουν οι χρήστες ότι μια οριακή θετική απόκριση με SI από 1,6 έως 1,9 αποτελεί θετικό αποτέλεσμα, μπορεί να επιθυμούν να λάβουν υπόψη τις τιμές του SI σε συνδυασμό με συμπληρωματικές πληροφορίες, όπως η σχέση δόσης-απόκρισης, τα στοιχεία συστημικής τοξικότητας ή υπέρμετρου ερεθισμού και, εφόσον ενδείκνυται, η στατιστική σημαντικότητα (10). Θα πρέπει επίσης να συνεκτιμώνται διάφορες ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, μεταξύ των οποίων το κατά πόσον έχει δομική σχέση με γνωστές ευαισθητοποιητικές για το δέρμα ουσίες, το κατά πόσον προκαλεί υπέρμετρο ερεθισμό του δέρματος του ποντικού και το είδος της σχέσης δόσης-απόκρισης που παρατηρήθηκε. Αυτά και άλλα κριτήρια αναλύονται στη βιβλιογραφική πηγή (4).

33. Η συλλογή δεδομένων σε επίπεδο μεμονωμένου ποντικού καθιστά δυνατή τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων για τη διαπίστωση της ύπαρξης σχέσης δόσης-απόκρισης και του βαθμού της σχέσης αυτής. Η ενδεχόμενη στατιστική εκτίμηση θα μπορούσε να περιλαμβάνει αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης, καθώς και κατάλληλα προσαρμοσμένες συγκρίσεις των ομάδων δοκιμής (π.χ. συγκρίσεις κατά ζεύγη μεταξύ της ομάδας που λαμβάνει τη δόση και της παράλληλης ομάδας-μάρτυρα που λαμβάνει τον διαλύτη/φορέα). Οι στατιστικές αναλύσεις είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν, λόγου χάριν, γραμμική παλινδρόμηση ή δοκιμή William για την εκτίμηση των τάσεων της απόκρισης σε σχέση με τη δόση και δοκιμή Dunnett για τις συγκρίσεις κατά ζεύγη. Κατά την επιλογή της ενδεδειγμένης μεθόδου στατιστικής ανάλυσης, ο ερευνητής θα πρέπει να έχει επίγνωση των πιθανώς άνισων διακυμάνσεων (διασπορών) και άλλων συναφών προβλημάτων τα οποία ενδέχεται να επιβάλλουν μετασχηματισμό των δεδομένων ή μη παραμετρική στατιστική ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, ενδέχεται να χρειαστεί να εκτελέσει ο ερευνητής υπολογισμούς του SI και στατιστικές αναλύσεις με και χωρίς ορισμένα σημεία δεδομένων (καλούμενα μερικές φορές «έκτροπες τιμές»).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

Δεδομένα

34. Τα δεδομένα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα, στον οποίο εμφαίνονται η τιμή του δείκτη σήμανσης BrdU για κάθε ζώο, ο ομαδικός μέσος δείκτης σήμανσης BrdU/ζώο, η σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) και η μέση τιμή του SI για κάθε δοσολογική ομάδα σε σύγκριση με την παράλληλη ομάδα-μάρτυρα που υποβλήθηκε σε αγωγή με τον διαλύτη/φορέα.

Έκθεση δοκιμής

35. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία και μάρτυρες:

— στοιχεία ταυτότητας (π.χ. αριθ. CAS και EC, εφόσον υπάρχουν, πηγή, καθαρότητα, γνωστές προσμίξεις, αριθμός παρτίδας),

— σύσταση και φυσικές και χημικές ιδιότητες (π.χ. πτητικότητα, σταθερότητα, διαλυτότητα),

— προκειμένου για μείγματα, σύνθεση και εκατοστιαία αναλογία των συστατικών.

Διαλύτης/φορέας:

— στοιχεία ταυτότητας (καθαρότητα, συγκέντρωση, κατά περίπτωση, όγκος που χρησιμοποιήθηκε),

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα.

▼M3

Ζώα της δοκιμής:

— προέλευση των ποντικών της φυλής CBA,

— μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εφόσον είναι γνωστή,

— αριθμός και ηλικία των ζώων,

— προέλευση των ζώων, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής:

— προέλευση, αριθμός παρτίδας και δεδομένα του κατασκευαστή για τον ποιοτικό έλεγχο/διασφάλιση ποιότητας (ευαισθησία και εξειδίκευση του αντισώματος και όριο ανίχνευσης) του συνόλου αντιδραστηρίων (kit) για ELISA,

— λεπτομέρειες για την παρασκευή και εφαρμογή του δείγματος της ελεγχόμενης ουσίας,

— αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της δοκιμής προδιαλογής, εφόσον έχει διεξαχθεί),

— συγκεντρώσεις φορέα και ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν και συνολική ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας που χορηγήθηκε,

— λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, τύπος/προέλευση του σιτηρεσίου, προέλευση του νερού),

— λεπτομέρειες για τα προγράμματα αγωγής και δειγματοληψίας,

— μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας,

— κριτήρια χαρακτηρισμού της μελέτης ως θετικής ή αρνητικής,

— λεπτομέρειες για τυχόν παρεκκλίσεις από το πρωτόκολλο και επεξήγηση του τρόπου με τον οποίο αυτές επηρεάζουν τον σχεδιασμό και τα αποτελέσματα της μελέτης.

Έλεγχος αξιοπιστίας:

— περίληψη των αποτελεσμάτων του πιο πρόσφατου ελέγχου αξιοπιστίας, συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, τη συγκέντρωση και τον φορέα που χρησιμοποιήθηκε,

— δεδομένα του εργαστηρίου δοκιμών που αφορούν τον παράλληλο και/ή ιστορικό θετικό μάρτυρα και τον παράλληλο αρνητικό μάρτυρα (αγωγή με τον διαλύτη/φορέα),

— εάν δεν συμπεριελήφθη στη δοκιμή παράλληλος θετικός μάρτυρας, ημερομηνία διεξαγωγής της πιο πρόσφατης περιοδικής δοκιμής με θετικό μάρτυρα και σχετική έκθεση του εργαστηρίου, καθώς και έκθεση με λεπτομερή ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου για τον θετικό μάρτυρα που δικαιολογούν την απόφαση να μη συμπεριληφθεί παράλληλος θετικός μάρτυρας.

Αποτελέσματα:

— βάρος κάθε ποντικού κατά την έναρξη της χορήγησης των δόσεων και κατά τον προγραμματισμένο χρόνο ευθανασίας· καθώς και μέση τιμή και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM) για κάθε ομάδα αγωγής,

— για κάθε ζώο, χρόνος εκδήλωσης και εξέλιξη των σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου τυχόν ερεθισμού του δέρματος στο σημείο χορήγησης,

— πίνακας με τις τιμές του δείκτη σήμανσης BrdU ανά ποντικό και τις τιμές SI για κάθε δοσολογική ομάδα αγωγής,

— για κάθε ομάδα αγωγής, μέση τιμή του δείκτη σήμανσης BrdU/ποντικό και σχετική στατιστική έκφραση του σφάλματος (π.χ. SD, SEM), καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης έκτροπων τιμών,

▼M3

— υπολογισμένος SI και κατάλληλο μέτρο μεταβλητότητας στο οποίο συνεκτιμάται η μεταβλητότητα μεταξύ των ζώων, τόσο της ομάδας που υποβάλλεται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία όσο και των ομάδων-μαρτύρων,

— σχέση δόσης-απόκρισης,

— στατιστικές αναλύσεις, κατά περίπτωση.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

— σύντομος σχολιασμός των αποτελεσμάτων, της ανάλυσης της σχέσης δόσης-απόκρισης και, κατά περίπτωση, των στατιστικών αναλύσεων, με γνωμάτευση για τον χαρακτηρισμό ή μη της ελεγχόμενης ουσίας ως ευαισθητοποιητικής για το δέρμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-PRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Διατίθεται στον ιστότοπο: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς την «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών (33).

Ουσία συγκριτικής αξιολόγησης: ουσία, ευαισθητοποιητική ή μη, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία συγκριτικής αξιολόγησης πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) σταθερή(-ές) και αξιόπιστη(-ες) προέλευση(-εις), ii) δομική και λειτουργική αναλογία προς την τάξη των ελεγχόμενων ουσιών, iii) γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά, iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

Ψευδαρνητικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως αρνητικής ή μη δραστικής με μέθοδο δοκιμών, ενώ στην πραγματικότητα είναι θετική ή δραστική (33).

Ψευδοθετικό αποτέλεσμα: ο εσφαλμένος χαρακτηρισμός ελεγχόμενης ουσίας ως θετικής ή δραστικής με δοκιμή, ενώ στην πραγματικότητα είναι αρνητική ή μη δραστική (33).

Κίνδυνος: το δυναμικό δυσμενούς επίδρασης στην υγεία ή στο περιβάλλον. Η δυσμενής επίδραση εκδηλώνεται μόνο εάν τα επίπεδα έκθεσης είναι επαρκή.

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: μέτρο του βαθμού στον οποίο διαφορετικά ειδικευμένα εργαστήρια μπορούν να επιτυγχάνουν ποιοτικά και ποσοτικά παραπλήσια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο και υποβάλλοντας σε δοκιμή την ίδια ελεγχόμενη ουσία. Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα προσδιορίζεται κατά τις διαδικασίες προεπικύρωσης και επικύρωσης και αποτελεί ένδειξη του κατά πόσον υπάρχει δυνατότητα επιτυχούς μεταφοράς μιας δοκιμής μεταξύ εργαστηρίων· καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων» (33).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο ειδικευμένα άτομα μπορούν να επαναλάβουν με επιτυχία τα ίδια αποτελέσματα εντός του ίδιου εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Καλείται επίσης «αναπαραγωγιμότητα εντός του εργαστηρίου» (33).

Έκτροπη τιμή: έκτροπη τιμή (outlier) είναι μια παρατήρηση σε τυχαίο δείγμα πληθυσμού η οποία διαφέρει σημαντικά από άλλες τιμές αυτού του δείγματος.

Διασφάλιση ποιότητας: διαχειριστική διαδικασία με την οποία αξιολογούνται, από άτομα ανεξάρτητα από εκείνα που εκτελούν τις δοκιμές, η τήρηση των προτύπων, των απαιτήσεων και των διαδικασιών τήρησης αρχείων που αφορούν τις εργαστηριακές δοκιμές, καθώς και η ορθότητα της μεταφοράς δεδομένων.

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (33).

Δερματική ευαισθητοποίηση: ανοσολογική διαδικασία που είναι αποτέλεσμα της τοπικής έκθεσης ευπαθούς ατόμου σε επαγωγικό χημικό αλλεργιογόνο, το οποίο προκαλεί δερματική ανοσοαπόκριση που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευαισθητοποίησης εξ επαφής.

Δείκτης διέγερσης (SI): αριθμητική τιμή η οποία υπολογίζεται προκειμένου να εκτιμηθεί το δερματικό ευαισθητοποιητικό δυναμικό μιας ελεγχόμενης ουσίας και ισούται με την αναλογία του πολλαπλασιασμού στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή με την ουσία προς τον πολλαπλασιασμό στην ομάδα που υποβάλλεται ταυτόχρονα σε αγωγή με τον φορέα.

Ελεγχόμενη ουσία (καλούμενη επίσης «ελεγχόμενη χημική ουσία»): κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

▼M4

Β.52. ΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ — ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΕΩΝ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 436 του ΟΟΣΑ (2009). Η πρώτη TG 403 για την οξεία αναπνευστική τοξικότητα εκδόθηκε το 1981 και έκτοτε έχει αναθεωρηθεί [βλέπε κεφάλαιο Β.2 του παρόντος παραρτήματος (1)]. Η ανάπτυξη μιας μεθόδου για τις κλάσεις οξείας τοξικότητας (ATC) μέσω αναπνευστικής έκθεσης (2) (3) (4) θεωρήθηκε κατάλληλη μετά την έκδοση της αναθεωρημένης μεθόδου ATC μέσω έκθεσης από το στόμα (κεφάλαιο Β.1γ του παρόντος παραρτήματος) (5). Η αναδρομική αξιολόγηση των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών ATC για την οξεία αναπνευστική τοξικότητα κατέδειξε ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για χρήση στην ταξινόμηση και επισήμανση (6). Η μέθοδος δοκιμών ATC αναπνευστικής τοξικότητας επιτρέπει την εφαρμογή σειριακών σταδίων με καθορισμένες συγκεντρώσεις στόχο για την ταξινόμηση της τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Η θνησιμότητα χρησιμοποιείται ως βασικό καταληκτικό σημείο. Ωστόσο, τα ζώα που πονούν πολύ, που εμφανίζουν έντονη δυσφορία, που υποφέρουν ή που είναι ετοιμοθάνατα πρέπει να θανατώνονται με μη βάναυσο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται η ταλαιπωρία τους. Κατευθύνσεις για τα μη βάναυσα καταληκτικά σημεία παρέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 19 του ΟΟΣΑ (7).

2. Κατευθύνσεις για την εφαρμογή και την ερμηνεία της παρούσας μεθόδου δοκιμών περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης GD 39 για τη διεξαγωγή δοκιμών οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (8).

3. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο προσάρτημα 1 και στο έγγραφο GD 39 (8).

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει πληροφορίες για τις επικίνδυνες ιδιότητες και επιτρέπει την ταξινόμηση και κατάταξη των ελεγχόμενων χημικών ουσιών σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 για την ταξινόμηση των χημικών που προκαλούν οξεία τοξικότητα (9). Εάν απαιτούνται σημειακές εκτιμήσεις των τιμών LC_{50} ή αναλύσεις συγκέντρωσης-απόκρισης, το κεφάλαιο Β.2 του παρόντος παραρτήματος (1) αποτελεί κατάλληλη μέθοδο δοκιμών που θα πρέπει να εφαρμόζεται. Περαιτέρω κατευθύνσεις για την επιλογή μεθόδου δοκιμών περιέχονται στο έγγραφο καθοδήγησης αριθ. 39 (8). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν προορίζεται συγκεκριμένα για τον έλεγχο εξειδικευμένων υλικών, όπως ασθενώς διαλυτών ισομετρικών ή ινωδών υλικών ή τεχνητών νανοϋλικών.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

5. Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο δοκιμών το εργαστήριο ελέγχου θα πρέπει να εξετάζει όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία, συμπεριλαμβανομένων υφιστάμενων μελετών τα στοιχεία των οποίων θα υποστήριζαν τη μη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών, ώστε να ελαχιστοποιείται η χρήση ζώων. Πληροφορίες που μπορούν να βοηθήσουν στην επιλογή των καταλληλότερων ειδών, στελεχών, φύλων, τρόπων έκθεσης και των κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου περιλαμβάνουν την ταυτότητα, τη χημική δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας· αποτελέσματα δοκιμών τοξικότητας *in vitro* ή *in vivo*· προβλεπόμενες χρήσεις και δυνητική έκθεση του ανθρώπου· διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR και τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς χημικές ουσίες. Συγκεντρώσεις που αναμένεται να προκαλούν έντονο πόρο και δυσφορία, λόγω της διαβρωτικής [1] ή ιδιαιτέρως ερεθιστικής τους δράσης, δεν πρέπει να ελέγχονται με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών [βλέπε έγγραφο GD 39 (8)].

---

[1] Η αξιολόγηση της διαβρωτικής ικανότητας θα πρέπει να βασίζεται σε εμπειρογνωμοσύνη με τη χρήση στοιχείων όπως η πείρα σε ανθρώπους και ζώα, υπάρχοντα δεδομένα (in vitro), π.χ. βάσει των κεφαλαίων Β.40 (10) και Β.40β (11) του παρόντος παραρτήματος ή της κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών 435 του ΟΟΣΑ (12), τιμές pH, πληροφορίες για παρόμοιες χημικές ουσίες ή οποιαδήποτε άλλα συναφή δεδομένα.

▼M4

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Η δοκιμή βασίζεται σε μια βαθμιδωτή διαδικασίας μέσω της οποίας λαμβάνονται επαρκείς πληροφορίες για την οξεία αναπνευστική τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατά τη διάρκεια μιας περιόδου έκθεσης 4 ωρών, ώστε να καθίσταται δυνατή η ταξινόμησή της. Ενδέχεται να εφαρμόζονται άλλοι χρόνοι έκθεσης για την εξυπηρέτηση ειδικών κανονιστικών σκοπών. Σε καθένα από τα καθορισμένα στάδια συγκέντρωσης, ελέγχονται 3 ζώα από κάθε φύλο. Ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πεθαίνουν και/ή βρίσκονται σε ετοιμοθάνατη κατάσταση, ενδέχεται να επαρκούν 2 στάδια για την εκτίμηση της οξείας τοξικότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία ότι ένα φύλο είναι πιο ευπαθές από το άλλο, τότε η δοκιμή ενδέχεται να συνεχιστεί μόνο με το πλέον ευπαθές φύλο. Το αποτέλεσμα του προηγούμενου σταδίου καθορίζει το επόμενο στάδιο, έτσι ώστε:

α) να μην απαιτείται περαιτέρω δοκιμή·

β) να πραγματοποιούνται δοκιμές σε τρία ζώα ανά φύλο· ή

γ) να πραγματοποιούνται δοκιμές σε 6 ζώα του πλέον ευπαθούς φύλου μόνο· ήτοι οι εκτιμήσεις κατώτερου ορίου της κλάσης τοξικότητας πρέπει να βασίζονται σε 6 ζώα ανά ομάδα συγκέντρωσης, ανεξαρτήτως φύλου.

7. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν σαφή σημεία πόνου ή έντονης και διαρκούς δυσφορίας, θανατώνονται με ευθανασία και λαμβάνονται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων με τον ίδιο τρόπο όπως τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη δοκιμή. Τα κριτήρια για τη λήψη της απόφασης να θανατωθούν ετοιμοθάνατα ή βαρέως πάσχοντα ζώα, καθώς και οι κατευθύνσεις για την αναγνώριση των ενδείξεων προβλέψιμου ή επικείμενου θανάτου, αποτελούν το αντικείμενο του εγγράφου καθοδήγησης αριθ. 19 για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (7).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή των ειδών ζώων

8. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή, νεαρά ενήλικα ζώα των συνήθων εργαστηριακών φυλών. Το προτιμώμενο είδος είναι ο επίμυς και εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση.

Προετοιμασία των ζώων

9. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Κατά την ημέρα της έκθεσης, τα ζώα θα πρέπει να είναι νεαρά ενήλικα, ηλικίας 8 έως 12 εβδομάδων, ενώ το εύρος της διακύμανσης βαρών των ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους για κάθε φύλο οποιωνδήποτε προηγουμένως εκτεθειμένων ζώων της ίδιας ηλικίας. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία και σημαίνονται με τρόπο που επιτρέπει την αναγνώριση του καθενός. Τα ζώα διατηρούνται στους κλωβούς τους επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου. Τα ζώα πρέπει επίσης να εγκλιματίζονται στην πειραματική συσκευή για σύντομο χρονικό διάστημα πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, καθώς αυτό θα μειώσει το άγχος που προκαλείται από την εισαγωγή στο νέο περιβάλλον.

Ζωοτεχνία

10. Η θερμοκρασία στην αίθουσα πειραματόζωων θα πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται, σε ιδανικές συνθήκες, εντός ενός εύρους 30 έως 70 %, αν και αυτό ενδέχεται να μην είναι δυνατόν όταν χρησιμοποιείται το νερό ως φορέας. Πριν και μετά την έκθεση, τα ζώα πρέπει γενικά να στεγάζονται σε κλωβούς σε ομάδες ανά φύλο και συγκέντρωση, αλλά ο αριθμός των ζώων ανά κλωβό δεν πρέπει να εμποδίζει την παρατήρηση κάθε ζώου, ενώ θα πρέπει να ελαχιστοποιεί τυχόν απώλειες λόγω κανιβαλισμού ή μαχών. Όταν τα ζώα πρόκειται να εκτεθούν μόνο ρινικά, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να εγκλιματίζονται στους σωλήνες συγκράτησης. Οι σωλήνες συγκράτησης δεν θα πρέπει να προκαλούν περιττή φυσική, θερμική δυσφορία ή δυσφορία λόγω ακινητοποίησης στα

▼M4

ζώα. Η συγκράτηση ενδέχεται να επηρεάζει τα φυσικά καταληκτικά σημεία, όπως τη θερμοκρασία του σώματος (υπερθερμία) και/ή τον όγκο του αναπνεόμενου αέρα ανά λεπτό. Εάν υπάρχουν διαθέσιμα γενικά δεδομένα που δείχνουν ότι δεν προκαλούνται τέτοιες αλλαγές σε σημαντικό βαθμό, τότε δεν είναι απαραίτητη η προκαταρκτική προσαρμογή στους σωλήνες συγκράτησης. Τα ζώα που εκτίθενται ολόσωμα σε αερόλυμα θα πρέπει να στεγάζονται ατομικά κατά τη διάρκεια της έκθεσης, ώστε να αποφεύγεται η διήθηση του ελεγχόμενου αερολύματος μέσω του τριχώματος των ζώων που στεγάζονται στον ίδιο κλωβό. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά και πιστοποιημένα εργαστηριακά σιτηρέσια, εκτός από την περίοδο έκθεσης, συνοδευόμενα από απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού από το δίκτυο ύδρευσης. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών.

Θάλαμοι εισπνοής

11. Κατά την επιλογή θαλάμου εισπνοής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η φύση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και ο στόχος της δοκιμής. Προτιμώμενος τρόπος έκθεσης είναι η ρινική έκθεση (ο εν λόγω όρος περιλαμβάνει κεφαλική, ρινική ή ρυγχική έκθεση). Η ρινική έκθεση προτιμάται γενικά για μελέτες με υγρά ή στερεά αερολύματα και για ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνώνονται σε αερολύματα. Ειδικοί στόχοι της μελέτης μπορεί να επιτυγχάνονται καλύτερα με μέθοδο ολόσωμης έκθεσης, αλλά αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται στην έκθεση της μελέτης. Για να εξασφαλίζεται η σταθερότητα της ατμόσφαιρας κατά τη χρήση θαλάμου ολόσωμης έκθεσης, ο συνολικός όγκος των ελεγχόμενων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του θαλάμου. Οι αρχές των τεχνικών ρινικής και ολόσωμης έκθεσης, καθώς και τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους, περιγράφονται στο έγγραφο GD 39 (8).

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χορήγηση των συγκεντρώσεων

12. Συνιστάται να εφαρμόζεται καθορισμένη διάρκεια έκθεσης τεσσάρων ωρών, εκτός του χρόνου εξισορρόπησης. Ενδέχεται να απαιτείται επιλογή διαφορετικής διάρκειας για την εκπλήρωση συγκεκριμένων απαιτήσεως. Ωστόσο, σχετική αιτιολόγηση πρέπει να παρέχεται στην έκθεση της μελέτης [βλ. GD 39 (8)]. Τα ζώα που εκτίθενται σε θαλάμους ολόσωμης έκθεσης θα πρέπει να στεγάζονται απομονωμένα ώστε να αποφευχθεί η κατάποση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατά την περιποίηση από τα άλλα ζώα που στεγάζονται στον κλωβό. Κατά την περίοδο έκθεσης τα ζώα θα πρέπει να στερούνται τροφής. Νερό μπορεί να παρέχεται καθ' όλη τη διάρκεια της ολόσωμης έκθεσης.

13. Τα ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία σε μορφή αερίου, ατμού, αερολύματος ή μείγματος αυτών. Η φυσική κατάσταση που ελέγχεται εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, την επιλεχθείσα συγκέντρωση και/ή τη φυσική μορφή που είναι πιθανότερο να υπάρχει κατά τον χειρισμό και τη χρήση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Υγροσκοπικές και χημικά δραστικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή υπό συνθήκες ξηρού αέρα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην παράγονται εκρηκτικές συγκεντρώσεις.

Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

14. Πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων για όλα τα αερολύματα και για τους ατμούς που ενδέχεται να συμπυκνυκνωθούν σε αερολύματα. Για να είναι δυνατή η έκθεση όλων των σχετικών περιοχών της αναπνευστικής οδού, συνιστώνται αερολύματα με διάμεσο αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) 1 έως 4 μm, με γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g) από 1,5 έως 3,0 (8) (13) (14). Παρόλο που θα πρέπει να καταβάλλονται εύλογες προσπάθειες για τη συμμόρφωση με το πρότυπο αυτό, εάν αυτό δεν είναι δυνατό θα πρέπει να πραγματοποιείται εμπειρογνωμοσύνη. Παραδείγματος χάριν, καπνοί μετάλλων ενδέχεται να υπολείπονται του προτύπου αυτού, ενώ φορτισμένα σωματίδια, ίνες και υγροσκοπικά υλικά (των οποίων το μέγεθος αυξάνεται στο υγρό περιβάλλον της αναπνευστικής οδού) ενδέχεται να το υπερβαίνουν.

▼M4

Παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε φορέα

15. Μπορεί να χρησιμοποιείται φορέας για την παραγωγή κατάλληλης συγκέντρωσης και μεγέθους σωματιδίων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην ατμόσφαιρα. Κατά κανόνα, θα πρέπει να προτιμάται το νερό. Τα σωματιδιακά υλικά μπορούν να υποβάλλονται σε μηχανικές διεργασίες ώστε να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη κατανομή μεγέθους σωματιδίων, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην αποσυντίθεται και να μην αλλοιώνεται η ελεγχόμενη χημική ουσία. Στις περιπτώσεις που θεωρείται ότι μηχανικές διεργασίες έχουν αλλοιώσει τη χημική σύσταση της ουσίας (π.χ. ακραίες θερμοκρασίες από υπερβολική άλεση λόγω τριβής), η σύσταση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει να εξακριβώνεται αναλυτικά. Θα πρέπει να λαμβάνεται κατάλληλη μέριμνα, ώστε να μη μολύνεται η ελεγχόμενη χημική ουσία. Δεν είναι απαραίτητο να υποβάλλονται σε δοκιμή μη εύθρυπτα κοκκώδη υλικά που έχουν σκοπίμως συντεθεί έτσι ώστε να είναι μη εισπνεύσιμα. Θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμή αντοχής στη φθορά λόγω τριβής ώστε να αποδεικνύεται ότι δεν παράγονται εισπνεύσιμα σωματίδια κατά τον χειρισμό κοκκώδους υλικού. Εάν παράγονται εισπνεύσιμα σωματίδια κατά τη δοκιμή αντοχής στη φθορά λόγω τριβής, θα πρέπει να εκτελείται δοκιμή αναπνευστικής τοξικότητας.

Ζώα-μάρτυρες

16. Δεν είναι απαραίτητη μια παράλληλη ομάδα αρνητικών (αέρας) μαρτύρων. Όταν χρησιμοποιείται άλλος φορέας εκτός από το νερό για τη δημιουργία της πειραματικής ατμόσφαιρας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ομάδα-μάρτυρας για τον φορέα μόνο όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα αναπνευστικής τοξικότητας. Εάν η μελέτη τοξικότητας μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας που έχει μορφοποιηθεί σε φορέα δεν αποκαλύψει τοξικότητα, θεωρείται ότι ο φορέας δεν είναι τοξικός στην ελεγχόμενη συγκέντρωση. Συνεπώς δεν απαιτείται μάρτυρας για τον φορέα.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΘΕΣΗΣ

Ροή αέρα στον θάλαμο

17. Η ροή του αέρα μέσω του θαλάμου πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, να παρακολουθείται συνεχώς και να καταγράφεται τουλάχιστον σε ωριαία βάση κατά τη διάρκεια κάθε έκθεσης. Η παρακολούθηση της ελεγχόμενης συγκέντρωσης στην ατμόσφαιρα (ή σταθερότητα) περιλαμβάνει ολοκληρωτική μέτρηση όλων των δυναμικών παραμέτρων και αποτελεί έμμεσο τρόπο ελέγχου όλων των σχετικών δυναμικών παραμέτρων παραγωγής της ατμόσφαιρας. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η εκ νέου αναπνοή σε θαλάμους ρινικής έκθεσης στις περιπτώσεις που η ροή του αέρα μέσω του συστήματος έκθεσης είναι ανεπαρκής για την παροχή δυναμικής ροής ατμόσφαιρας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Υπάρχουν προβλεπόμενες μεθοδολογίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποδειχθεί ότι δεν πραγματοποιείται εκ νέου αναπνοή υπό τις επιλεγμένες συνθήκες λειτουργίας (8) (15). Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 19 % και η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 %. Εάν υπάρχει λόγος να θεωρείται ότι δεν μπορεί να υπάρξει συμμόρφωση με τα πρότυπα αυτά, πρέπει να μετρώνται οι συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα.

Θερμοκρασία και σχετική υγρασία του θαλάμου

18. Η θερμοκρασία του θαλάμου πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 3 °C. Η σχετική υγρασία στη ζώνη αναπνοής των ζώων, τόσο για ρινική όσο και για ολόσωμη έκθεση, θα πρέπει να παρακολουθείται και να καταγράφεται τουλάχιστον τρεις φορές στην περίπτωση έκθεσης έως 4 ωρών, και ανά ώρα στην περίπτωση έκθεσης μικρότερης διάρκειας. Η σχετική υγρασία θα πρέπει σε ιδανικές συνθήκες να διατηρείται σε επίπεδα από 30 έως 70 %, αλλά αυτό μπορεί να είναι είτε ανέφικτο (π.χ. κατά τη δοκιμή μειγμάτων που έχουν ως βάση το νερό) ή μη μετρήσιμο λόγω του αλληλεπίδρασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με τη μέθοδο δοκιμών.

▼M4

Ελεγχόμενη χημική ουσία: ονομαστική συγκέντρωση

19. Εάν είναι εφικτό, θα πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται η ονομαστική συγκέντρωση στον θάλαμο έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση ορίζεται ως η μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του συστήματος έκθεσης. Η ονομαστική συγκέντρωση δεν χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης των ζώων, αλλά μια σύγκριση της ονομαστικής συγκέντρωσης και της πραγματικής συγκέντρωσης αποτελεί ένδειξη της αποτελεσματικότητας παραγωγής του συστήματος δοκιμών και, συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη προβλημάτων παραγωγής.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: πραγματική συγκέντρωση

20. Η πραγματική συγκέντρωση ορίζεται ως η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στη ζώνη αναπνοής των ζώων σε θάλαμο εισπνοής. Οι πραγματικές συγκεντρώσεις μπορούν να ληφθούν είτε με ειδικές μεθόδους (π.χ. άμεση δειγματοληψία, μέθοδοι προσρόφησης ή χημικής αντίδρασης και επακόλουθος αναλυτικός χαρακτηρισμός) είτε με μη ειδικές μεθόδους, όπως η σταθμική ανάλυση με ηθμό. Η χρήση σταθμικής ανάλυσης είναι αποδεκτή μόνο για αερολύματα σκόνης με ένα μέρος ή για αερολύματα υγρών χαμηλής πτητικότητας και θα πρέπει να υποστηρίζεται από κατάλληλους χαρακτηρισμούς της ελεγχόμενης ουσίας πριν από τη μελέτη. Η συγκέντρωση αερολυμάτων σκόνης με πολλά μέρη μπορεί επίσης να προσδιοριστεί με σταθμική ανάλυση. Ωστόσο, απαιτούνται για αυτό αναλυτικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η σύνθεση του αερομεταφερόμενου υλικού είναι παρόμοια με το αρχικό υλικό. Εάν οι πληροφορίες αυτές δεν είναι διαθέσιμες, ενδέχεται να απαιτείται εκ νέου ανάλυση της ελεγχόμενης ουσίας (ιδανικά, στην αερομεταφερόμενη κατάσταση) ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Σε ουσίες σε μορφή αερολύματος που ενδέχεται να εξατμίζονται ή να εξαχνίζονται, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι όλες οι φάσεις έχουν συλλεχθεί με την επιλεχθείσα μέθοδο. Οι επιδιωκόμενες συγκεντρώσεις, οι ονομαστικές και οι πραγματικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αναφέρονται στην έκθεση μελέτης, αλλά μόνο οι πραγματικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται σε στατιστικές αναλύσεις για τον υπολογισμό τιμών θανατηφόρας συγκέντρωσης.

21. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία παρτίδα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν είναι δυνατό, και το ελεγχόμενο δείγμα θα πρέπει να αποθηκεύεται υπό συνθήκες που διατηρούν την καθαρότητά του, την ομοιογένειά του και τη σταθερότητά του. Πριν από την έναρξη της μελέτης, η ελεγχόμενη ουσία θα πρέπει να χαρακτηρίζεται, ως προς την καθαρότητά της και, εάν είναι τεχνικά εφικτό, ως προς την ταυτότητα και τις ποσότητες τυχόν εντοπισθέντων ρύπων και προσμείξεων. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί, μεταξύ άλλων, από τα ακόλουθα δεδομένα: χρόνος κατακράτησης και σχετική ζώνη κορυφής, μοριακό βάρος μέσω αναλύσεων φασματομετρίας μάζας ή αεριοχρωματογραφίας ή άλλες εκτιμήσεις. Παρόλο που η ταυτότητα του ελεγχόμενου δείγματος δεν αποτελεί ευθύνη του εργαστηρίου ελέγχου, θα ήταν σκόπιμο να επιβεβαιώνει το εργαστήριο τον χαρακτηρισμό από τον χορηγό, έστω και σε περιορισμένη έκταση (π.χ. χρώμα, φυσική κατάσταση κ.λπ.).

22. Η ατμόσφαιρα έκθεσης διατηρείται σταθερή στο μέτρο του εφικτού και παρακολουθείται συνεχώς και/ή κατά διαστήματα ανάλογα με τη μέθοδο ανάλυσης. Όταν εφαρμόζεται δειγματοληψία κατά διαστήματα, θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα της ατμόσφαιρας του θαλάμου τουλάχιστον δύο φορές κατά τη διάρκεια μελέτης τεσσάρων ωρών. Εάν δεν είναι εφικτό λόγω περιορισμένου ρυθμού ροής αέρα ή χαμηλών συγκεντρώσεων, μπορεί να λαμβάνεται ένα δείγμα καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Εάν εμφανίζονται έντονες διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων, στις επόμενες συγκεντρώσεις που θα υποβληθούν σε δοκιμή θα πρέπει να λαμβάνονται τέσσερα δείγματα ανά έκθεση. Τα επιμέρους δείγματα συγκέντρωσης από τον θάλαμο δεν θα πρέπει να αποκλίνουν από τη μέση συγκέντρωση στον θάλαμο περισσότερο από ± 10 % για αέρια και ατμούς ή ± 20 % για υγρά ή στερεά αερολύματα. Ο χρόνος για την εξισορρόπηση του θαλάμου (t_{95}) πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται. Η διάρκεια της έκθεσης καλύπτει τον χρόνο παραγωγής της ελεγχόμενης ουσίας, στον οποίο λαμβάνονται υπόψη οι χρόνοι που απαιτούνται για την επίτευξη του t_{95}. Καθοδήγηση για την εκτίμηση του t_{95} παρέχει το έγγραφο GD 39 (8).

▼M4

23. Για πολύ περίπλοκα μείγματα που αποτελούνται από ατμούς/αέρια και αερολύματα (π.χ. ατμόσφαιρες καύσης και ελεγχόμενα χημικά εκπεμπόμενα από στοχοστρεφή προϊόντα/συσκευές τελικής χρήσης), κάθε φάση ενδέχεται να συμπεριφέρεται διαφορετικά σε θάλαμο εισπνοής. Έτσι, θα πρέπει να επιλέγεται τουλάχιστον μία ουσία δείκτης (αναλύτης), συνήθως η κύρια δραστική ουσία του μείγματος, σε κάθε φάση (ατμός/αέριο και αερόλυμα). Όταν η ελεγχόμενη ουσία είναι μείγμα, η αναλυτική συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται για ολόκληρο το μείγμα και όχι μόνο για τη δραστική ουσία ή το συστατικό (αναλύτης). Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις πραγματικές συγκεντρώσεις παρέχονται στο έγγραφο GD 39 (8).

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κατανομή μεγέθους σωματιδίων

24. Η κατανομή μεγέθους σωματιδίων των αερολυμάτων θα πρέπει να προσδιορίζεται τουλάχιστον δύο φορές κατά τη διάρκεια κάθε τετράωρης έκθεσης με τη χρήση κρουστικού διαχωριστήρα ή εναλλακτικού οργάνου, όπως ο αεροδυναμικός κατανεμητής σωματιδίων. Εάν μπορεί να αποδειχθεί ισοδυναμία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται μέσω κρουστικού διαχωριστήρα ή εναλλακτικού οργάνου, το εναλλακτικό όργανο μπορεί να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Παράλληλα με το κύριο όργανο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια δεύτερη συσκευή, όπως ένα σταθμικό φίλτρο ή πλυντρίδα αερίου/φυσαλιδοδείκτης, για να επιβεβαιώνει την απόδοση συλλογής του κύριου οργάνου. Η συγκέντρωση μάζας που λαμβάνεται μέσω ανάλυσης μεγέθους σωματιδίων θα πρέπει να είναι εντός των εύλογων ορίων συγκέντρωσης μάζας που λαμβάνονται μέσω ανάλυσης με φίλτρο [βλέπε GD 39 (8)]. Εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ισοδυναμία σε αρχικό στάδιο της μελέτης, οι περαιτέρω επιβεβαιωτικές μετρήσεις μπορούν να παραλείπονται. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε να ελαχιστοποιούνται τα αβέβαια δεδομένα που ενδέχεται να οδηγούν σε ανάγκη επανάληψης μιας έκθεσης. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων στην περίπτωση των ατμών, εάν υπάρχει πιθανότητα η συμπύκνωση των ατμών να οδηγήσει στον σχηματισμό αερολύματος ή εάν εντοπίζονται σε ατμόσφαιρα ατμών σωματίδια με δυναμικό πρόκλησης μεικτών φάσεων (βλέπε παράγραφο 14).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Κυρίως δοκιμή

25. Σε κάθε στάδιο χρησιμοποιούνται τρία ζώα ανά φύλο ή έξι ζώα του πλέον ευπαθούς φύλου. Σε περίπτωση ρινικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περίοδοι έκθεσης μπορούν να προσαρμόζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η δυσφορία που νιώθει το κάθε είδος. Το επίπεδο συγκέντρωσης που χρησιμοποιείται ως αρχική δόση επιλέγεται μεταξύ των τεσσάρων καθορισμένων επιπέδων και το αρχικό επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να είναι αυτό που είναι πιθανότερο να προκαλέσει τοξικότητα σε ορισμένα από τα εκτεθειμένα ζώα. Τα συστήματα δοκιμής αερίων, ατμών και αερολυμάτων (που περιλαμβάνονται στα προσαρτήματα 2-4) αντιπροσωπεύουν τη δοκιμή με τις κρίσιμες τιμές των κατηγοριών 1-4 του κανονισμού CLP (9) για τα αέρια (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (προσάρτημα 2), για τους ατμούς (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (προσάρτημα 3) και για τα αερολύματα (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (προσάρτημα 4). Η κατηγορία 5, η οποία δεν εφαρμόζεται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (9), αφορά συγκεντρώσεις ανώτερες των αντίστοιχων οριακών συγκεντρώσεων. Για κάθε αρχική συγκέντρωση, εφαρμόζεται το αντίστοιχο σύστημα δοκιμής. Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη, έως ότου είναι δυνατό να γίνει κατηγοριοποίηση.

26. Το χρονικό διάστημα μεταξύ των εκθέσεων στις οποίες υποβάλλονται οι ομάδες καθορίζεται από τον χρόνο εμφανίσεως, τη διάρκεια και τη σοβαρότητα των τοξικών εκδηλώσεων. Η έκθεση ζώων στο επόμενο επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να καθυστερεί έως ότου υπάρχει εύλογη πεποίθηση ότι τα ζώα που υποβλήθηκαν στην προηγούμενη δοκιμή θα επιβιώσουν. Συνιστάται να μεσολαβεί διάστημα τριών ή τεσσάρων ημερών μεταξύ των εκθέσεων σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση καθυστερημένων εκδηλώσεων τοξικότητας. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί ενδέχεται να προσαρμόζεται κατά περίπτωση, π.χ. στην περίπτωση αβέβαιων αποκρίσεων.

▼M4

Οριακή δοκιμή

27. Οριακή δοκιμή χρησιμοποιείται όταν η ελεγχόμενη ουσία είναι γνωστή ή αναμένεται να είναι ουσιαστικά μη τοξική, ήτοι, να προκαλεί τοξικές επιδράσεις μόνο μόνον εάν ληφθεί σε δόσεις μεγαλύτερες από τις οριακές τιμές που προβλέπονται στις νομοθετικές ρυθμίσεις. Στοιχεία σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας είναι δυνατόν να συναχθούν από τα αποτελέσματα δοκιμών που έχουν διεξαχθεί με ανάλογες ουσίες ή μείγματα, λαμβάνοντας υπόψη την ταυτότητα και την εκατοστιαία αναλογία των σημαντικών από τοξικολογική άποψη συστατικών. Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας ή εάν η τελευταία αναμένεται να είναι τοξική, πρέπει να διεξάγεται η κυρίως δοκιμή [περαιτέρω καθοδήγηση παρέχει το έγγραφο GD 39 (8)].

28. Κατά τη συνήθη διαδικασία, τρία ζώα ανά φύλο ή έξι ζώα του πλέον ευπαθούς φύλου εκτίθενται σε συγκεντρώσεις 20 000 ppm στην περίπτωση αερίων, 20 mg/l στην περίπτωση ατμών και 5 mg/l στην περίπτωση σκονών/σταγονιδίων, αντιστοίχως (εάν είναι εφικτό), διαδικασία η οποία λειτουργεί ως οριακή δοκιμή στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Κατά τη διεξαγωγή δοκιμών με αερολύματα, κύριος στόχος θα πρέπει να είναι η επίτευξη εισπνεύσιμου μεγέθους σωματιδίων (ήτοι, MMAD 1-4 μm). Αυτό είναι δυνατό με τις περισσότερες ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε συγκέντρωση 2 mg/l. Ο έλεγχος αερολυμάτων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2 mg/l θα πρέπει να επιχειρείται μόνο εάν είναι δυνατόν να επιτευχθεί εισπνεύσιμο μέγεθος σωματιδίων [βλέπε GD 39 (8)]. Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα (GHS) (16), η διεξαγωγή δοκιμών πάνω από μια οριακή συγκέντρωση δεν συνιστάται για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Το ενδεχόμενο διεξαγωγής δοκιμών με δόσεις της κλίμακας που ορίζει την κατηγορία 5 του GHS (16), η οποία δεν εφαρμόζεται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (9), θα πρέπει να εξετάζεται μόνο στην περίπτωση που είναι πολύ πιθανόν τα αποτελέσματα μιας τέτοιας δοκιμής να έχουν άμεση σχέση με την προστασία της υγείας των ανθρώπων και εφόσον παρέχεται αιτιολόγηση στην έκθεση μελέτης. Στην περίπτωση δυνητικώς εκρήξιμων ελεγχόμενων ουσιών, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται οι συνθήκες που ευνοούν εκρήξεις. Για να αποφεύγεται η περιττή χρήση των ζώων, θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμαστική διαδικασία χωρίς ζώα πριν από την οριακή δοκιμή ώστε να εξασφαλίζεται η δυνατότητα επίτευξης των απαραιτήτων συνθηκών θαλάμου για μια οριακή δοκιμή.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

29. Τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε κλινική εξέταση συχνά κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Έπειτα από την έκθεση, τα ζώα υποβάλλονται σε κλινική παρατήρηση τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα της έκθεσης ή συχνότερα εάν είναι αναγκαίο ανάλογα με την απόκριση του ζώου στην αγωγή, και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μια φορά ημερησίως για 14 ημέρες συνολικά. Η διάρκεια της περιόδου παρατήρησης δεν είναι προκαθορισμένη αλλά θα πρέπει να προσδιορίζεται βάσει της φύσης και του χρόνου εμφάνισης κλινικών εκδηλώσεων, καθώς και της διάρκειας της περιόδου ανάκαμψης. Ο χρόνος εμφανίσεως και εξαφανίσεως των τοξικών εκδηλώσεων είναι σημαντικός, ιδίως εάν παρατηρείται τάση καθυστερημένης εμφάνισης τοξικών συμπτωμάτων. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά και χωριστά για κάθε ζώο. Ζώα ετοιμοθάνατα ή που παρουσιάζουν έντονο πόνο και επίμονη σοβαρή δυσφορία πρέπει να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα κατά τη διεξαγωγή εξετάσεων για κλινικές εκδηλώσεις τοξικότητας, ώστε οι μειωμένες αρχικές εκδηλώσεις και οι παροδικές μεταβολές στην αναπνοή που προκαλούνται από τη διαδικασία της έκθεσης, να μην θεωρηθούν εσφαλμένα ως σχετικές με την αγωγή επιδράσεις. Οι αρχές και τα κριτήρια που συνοψίζονται στο έγγραφο καθοδήγησης για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (7). Ο χρόνος θανάτου των ζώων που έχουν θανατωθεί προκειμένου να μην ταλαιπωρηθούν ή που έχουν βρεθεί νεκρά καταγράφεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

▼M4

30. Οι παρατηρήσεις στον κλωβό θα πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και το τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους καθώς και στο αναπνευστικό, κυκλοφοριακό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Όταν είναι δυνατό, θα πρέπει να σημειώνεται οποιαδήποτε διαφοροποίηση μεταξύ τοπικών και συστημικών επιδράσεων. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην παρατήρηση τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του ορθού μπορεί να παρέχει υποστηρικτικά αποδεικτικά στοιχεία αντανακλαστικής βραδύπνοιας ή υποθερμίας/υπερθερμίας που σχετίζεται με την αγωγή ή τη στέρηση της ελευθερίας.

Βάρος σώματος

31. Το βάρος του κάθε ζώου θα πρέπει να καταγράφεται μία φορά κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού, κατά την ημέρα της έκθεσης πριν από την έκθεση (ημέρα 0) και τουλάχιστον την 1η, την 3η και την 7η ημέρα μετά την έκθεση (και, στη συνέχεια, εβδομαδιαίως) και κατά τον χρόνο θανάτου ή ευθανασίας, εάν λαμβάνει χώρα μετά την 1η ημέρα. Το σωματικό βάρος θεωρείται κρίσιμος δείκτης τοξικότητας, συνεπώς τα ζώα που εμφανίζουν συνεχόμενη μείωσή του > 20 % σε σύγκριση με τις τιμές πριν από τη μελέτη θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά. Τα επιζώντα ζώα ζυγίζονται και θανατώνονται με ευθανασία στο τέλος της περιόδου μετά την έκθεση.

Παθολογοανατομία

32. Όλα τα πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένων των θανόντων κατά τη διάρκεια της δοκιμής, εκείνων που υποβάλλονται σε ευθανασία και εκείνων που αποσύρθηκαν από τη μελέτη για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, υποβάλλονται σε ολική νεκροψία. Εάν δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί νεκροψία αμέσως μετά την ανακάλυψη κάποιου νεκρού ζώου, το ζώο θα πρέπει να ψύχεται (όχι να καταψύχεται) σε θερμοκρασίες αρκετά χαμηλές ώστε να ελαχιστοποιείται η αυτόλυση. Η νεκροψία θα πρέπει να εκτελείται όσο το δυνατόν συντομότερα, κατά κανόνα εντός μιας ή δύο ημερών. Όλες οι μακροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις θα πρέπει να καταγράφονται για κάθε ζώο, δίδοντας ιδιαίτερη προσοχή σε τυχόν αλλοιώσεις της αναπνευστικής οδού.

33. Μπορούν να λαμβάνονται υπόψη επιπλέον εξετάσεις, που περιλαμβάνονται εκ των προτέρων στον σχεδιασμό, ώστε να διευρύνεται η ερμηνευτική αξία της μελέτης, όπως μέτρηση του βάρους των πνευμόνων των επιζώντων επιμύων και/ή παροχή αποδεικτικών στοιχείων ερεθισμού μέσω μικροσκοπικής εξέτασης της αναπνευστικής οδού. Στα ζώα που επιζούν 24 ή περισσότερες ώρες μπορεί να πραγματοποιείται εξέταση των οργάνων που εμφανίζουν μακροσκοπικώς παθολογικές αλλοιώσεις, καθώς των οργάνων που είναι γνωστό ή αναμένεται ότι θα επηρεαστούν. Ενδέχεται να προκύπτουν χρήσιμα στοιχεία από τη μικροσκοπική εξέταση ολόκληρης της αναπνευστικής οδού για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες που αντιδρούν με το νερό, όπως οξέα και υγροσκοπικές χημικές ουσίες.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Στοιχεία

34. Θα πρέπει να παρέχονται ατομικά στοιχεία για το βάρος των ζώων και τα ευρήματα της νεκροψίας. Τα δεδομένα κλινικής παρατήρησης πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει για κάθε ομάδα τον αριθμό των χρησιμοποιηθέντων ζώων, τον αριθμό των ζώων που εμφανίζουν συγκεκριμένες τοξικές εκδηλώσεις, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή που θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, τον χρόνο θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και χρονική πορεία των τοξικών εκδηλώσεων, αναστρεψιμότητα και ευρήματα νεκροψίας.

▼M4

Έκθεση δοκιμής

35. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, κατά περίπτωση:

Πειραματόζωα και διαχείρισή τους·

— περιγραφή των συνθηκών εγκλωβισμού, συμπεριλαμβανομένων των εξής: αριθμός (ή μεταβολή στον αριθμό) ζώων ανά κλωβό, στρωμνή, θερμοκρασία και σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, φωτοπερίοδος και προσδιορισμός του σιτηρεσίου,

— είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης άλλου είδους εκτός του επίμυ,

— αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,

— μέθοδο τυχαιοποίησης,

— λεπτομερή στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού (συμπεριλαμβανομένων του είδους και της πηγής του σιτηρεσίου και της πηγής του νερού),

— περιγραφή τυχόν προετοιμασίας πριν από τον έλεγχο, συμπεριλαμβανομένων του σιτηρεσίου, της περιόδου απομόνωσης και της αγωγής για ασθένειες.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

— φυσική κατάσταση, καθαρότητα και, κατά περίπτωση, φυσικές και χημικές ιδιότητες (συμπεριλαμβανομένης της ισομερείωσης),

— στοιχεία αναγνώρισης και αριθμός μητρώου Παροχής Υπηρεσιών για Χημικές Ουσίες («CAS»), εάν είναι γνωστός.

Φορέας

— αιτιολόγηση χρήσης του φορέα και αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα (εάν δεν είναι νερό),

— προϋπάρχοντα ή παράλληλα δεδομένα που καταδεικνύουν ότι ο φορέας δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της μελέτης.

Θάλαμος εισπνοής

— περιγραφή του θαλάμου εισπνοής συμπεριλαμβανομένων των διαστάσεων και του όγκου,

— πηγή και περιγραφή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την έκθεση ζώων, καθώς και για την παραγωγή της ατμόσφαιρας,

— εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας, του μεγέθους των σωματιδίων και της πραγματικής συγκέντρωσης,

— πηγή αέρα, επεξεργασία του παρεχόμενου/εξαγόμενου αέρα και σύστημα κλιματισμού που χρησιμοποιείται,

— μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση του εξοπλισμού ώστε να εξασφαλίζεται ομοιογενής πειραματική ατμόσφαιρα,

— διαφορά πίεσης (θετική ή αρνητική),

— θύρες έκθεσης ανά θάλαμο (ρινική έκθεση)· θέση των ζώων στο σύστημα (ολόσωμη έκθεση),

— χρονική ομοιογένεια/σταθερότητα της πειραματικής ατμόσφαιρας,

— θέση των αισθητήρων θερμοκρασίας και υγρασίας και δειγματοληψία της πειραματικής ατμόσφαιρας στον θάλαμο,

— ταχύτητες ροής αέρα, ταχύτητα ροής αέρα/θύρα έκθεσης (ρινική έκθεση) ή φορτίο ζώων/θάλαμο (ολόσωμη έκθεση),

— πληροφορίες για τον εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα, κατά περίπτωση,

▼M4

— χρόνος που απαιτήθηκε για την επίτευξη ισορροπίας στον θάλαμο εισπνοής (t_{95}),

— αριθμός μεταβολών όγκου ανά ώρα,

— συσκευές μέτρησης (κατά περίπτωση).

Δεδομένα έκθεσης

— αιτιολόγηση της επιλογής της συγκέντρωσης-στόχου για την κυρίως μελέτη,

— ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική μάζα της παραγόμενης ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσα στον θάλαμο εισπνοής διά του συνολικού όγκου αέρα που διαβιβάζεται μέσω του θαλάμου),

— πραγματικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που λαμβάνονται από τη ζώνη αναπνοής των ζώων· για ελεγχόμενα μείγματα που παράγουν ετερογενείς φυσικές μορφές (αέρια, ατμούς, αερολύματα), κάθε μορφή μπορεί να αναλύεται χωριστά,

— όλες οι ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αναφέρονται σε μονάδες μάζας (π.χ. mg/l, mg/m^3 κ.λπ.)· μπορούν επίσης να αναφέρονται παρενθετικά μονάδες όγκου (π.χ. ppm, ppb),

— κατανομή μεγέθους σωματιδίων, διάμεσος αεροδυναμικής διαμέτρου κατά μάζα (MMAD) και γεωμετρική τυπική απόκλιση (σ_g), συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων υπολογισμού τους. Θα πρέπει να αναφέρονται επιμέρους αναλύσεις μεγέθους σωματιδίων.

Συνθήκες δοκιμής

— λεπτομερή στοιχεία της παρασκευής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένων λεπτομερών στοιχείων διαδικασιών που έχουν ενδεχομένως χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του μεγέθους στερεών ουσιών ή για την παρασκευή διαλυμάτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Σε περιπτώσεις που μηχανικές διαδικασίες ενδέχεται να έχουν αλλοιώσει τη σύνθεση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, πρέπει να περιλαμβάνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων ώστε να επαληθεύεται η σύνθεση της ελεγχόμενης ουσίας,

— περιγραφή (κατά προτίμηση μαζί με διάγραμμα) του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της ατμόσφαιρας ελέγχου και την έκθεση των ζώων στην ατμόσφαιρα ελέγχου,

— λεπτομερή στοιχεία της χημικής αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε και επικύρωση της μεθόδου (συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας ανάκτησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από το μέσο δειγματοληψίας),

— αιτιολόγηση των επιλεγμένων συγκεντρώσεων ελέγχου.

Αποτελέσματα

— πίνακας με τη θερμοκρασία, την υγρασία και τη ροή αέρα στον θάλαμο,

— πίνακας με τα στοιχεία ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων στον θάλαμο,

— πίνακας με τα στοιχεία μεγέθους σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων συλλογής του δείγματος ανάλυσης, της κατανομής μεγέθους σωματιδίων και υπολογισμών της MMAD και της σ_g,

— πίνακας με τα δεδομένα απόκρισης και το επίπεδο συγκέντρωσης για κάθε ζώο (δηλαδή ζώα που παρουσίασαν συμπτώματα τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, της φύσης, της σοβαρότητας, και της διάρκειας των επιδράσεων),

— για κάθε ζώο, το βάρος που μετρήθηκε κατά τις ημέρες της μελέτης· ημερομηνία και χρόνος θανάτου, εάν έλαβε χώρα πριν από την προγραμματισμένη ευθανασία, χρονική πορεία εμφάνισης εκδηλώσεων τοξικότητας και εάν αυτές ήταν αναστρέψιμες για κάθε ζώο,

▼M4

— ευρήματα νεκροψίας και ιστοπαθολογικά ευρήματα για καθένα από τα ζώα, εφόσον διατίθενται,

— κατηγορία ταξινόμησης βάσει του κανονισμού CLP και κρίσιμη τιμή LC_{50}.

Συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

— Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δίδεται στην περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπλήρωση των κριτηρίων της μεθόδου δοκιμών, π.χ. της οριακής συγκέντρωσης ή του μεγέθους σωματιδίων.

— Θα πρέπει να καλύπτεται το ζήτημα της εισπνευσιμότητας των σωματιδίων βάσει των συνολικών ευρημάτων, ιδίως εάν τα σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων κριτήρια δεν ήταν δυνατό να εκπληρωθούν.

— Η συνολική αξιολόγηση της μελέτης πρέπει να περιλαμβάνει τη συνοχή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ονομαστικών και πραγματικών συγκεντρώσεων και τη σχέση της πραγματικής προς την ονομαστική συγκέντρωση.

— Θα πρέπει να αναφέρεται η πιθανή αιτία θανάτου και ο επικρατέστερος τρόπος δράσης (συστημική δράση έναντι τοπικής).

— Θα πρέπει να παρέχεται εξήγηση εάν έπρεπε να θανατωθούν με ευθανασία ζώα που πονούσαν ή που εμφάνιζαν εκδηλώσεις έντονης και διαρκούς δυσφορίας, βάσει των κριτηρίων του εγγράφου καθοδήγησης του ΟΟΣΑ για τα λιγότερο βάναυσα καταληκτικά σημεία (7).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Κεφάλαιο B.2 του παρόντος παραρτήματος: Οξεία τοξικότητα (αναπνευστική).

(2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., και Schlede E. (2003), Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System, *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

(3) Diener W., Kayser D. και Schlede E. (1997), The Inhalation Acute-Toxic-Class Method, Test Procedures and Biometric Evaluations, *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

(4) Diener W. και Schlede E. (1999), Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

(5) Κεφάλαιο B.1β του παρόντος παραρτήματος: Οξεία τοξικότητα από το στόμα — Μέθοδος των κλάσεων οξείας τοξικότητας.

(6) OECD (2009), Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris, Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(7) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(9) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 (ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1).

▼**M4**

(10) Κεφάλαιο Β.40 του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER).

(11) Κεφάλαιο Β.40α του παρόντος παραρτήματος: Διάβρωση του δέρματος in vitro: δοκιμή σε μοντέλο ανθρώπινου δέρματος.

(12) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(13) Phalen RF (2009), Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests, *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

(15) Pauluhn J. και Thiel A. (2007), A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers, *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167.

(16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html].

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M4

Προσάρτημα 2

Διαδικασία εφαρμοζόμενη για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις στην περίπτωση αερίων (ppm/4 ώρες)

Γενικές παρατηρήσεις ([1])

Η διαδικασία που ακολουθείται για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις περιγράφεται σχηματικά στα αντίστοιχα διαγράμματα δοκιμής του παρόντος προσαρτήματος.

Προσάρτημα 2α: Η αρχική συγκέντρωση είναι 100 ppm

Προσάρτημα 2β: Η αρχική συγκέντρωση είναι 500 ppm

Προσάρτημα 2γ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 2 500 ppm

Προσάρτημα 2δ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 20 000 ppm

Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη.

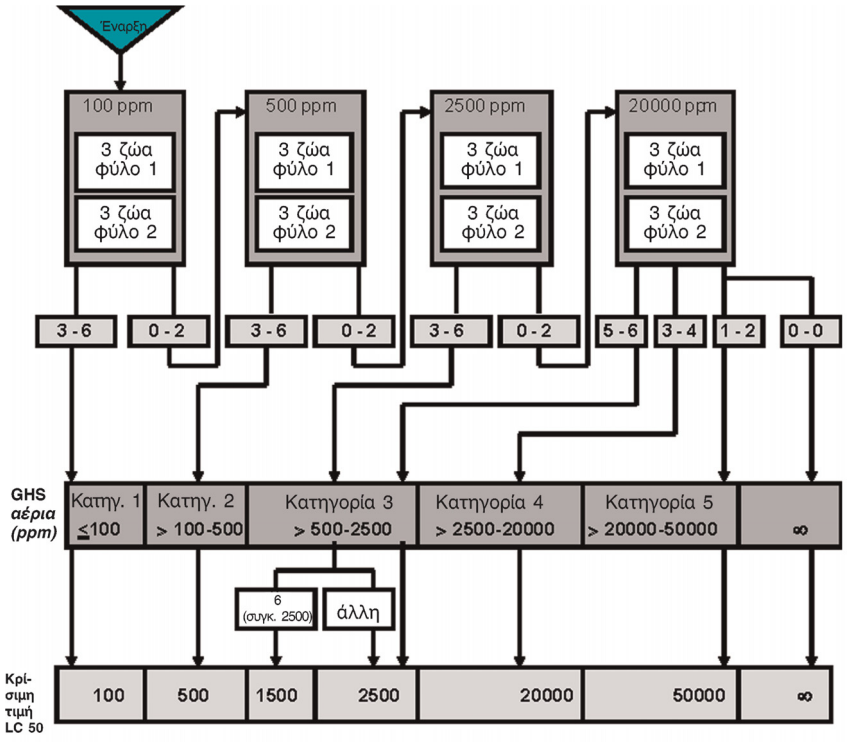
([1]) Στους ακόλουθους πίνακες γίνεται αναφορά στο Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Ουσιών (GHS). Το ισοδύναμο νομοθέτημα της ΕΕ είναι ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008. Στην περίπτωση οξείας αναπνευστικής τοξικότητας, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (9) δεν εφαρμόζεται για την κατηγορία 5.

▼M4

Προσάρτημα 2α

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 100 ppm/4 ώρες στην περίπτωση αερίων



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

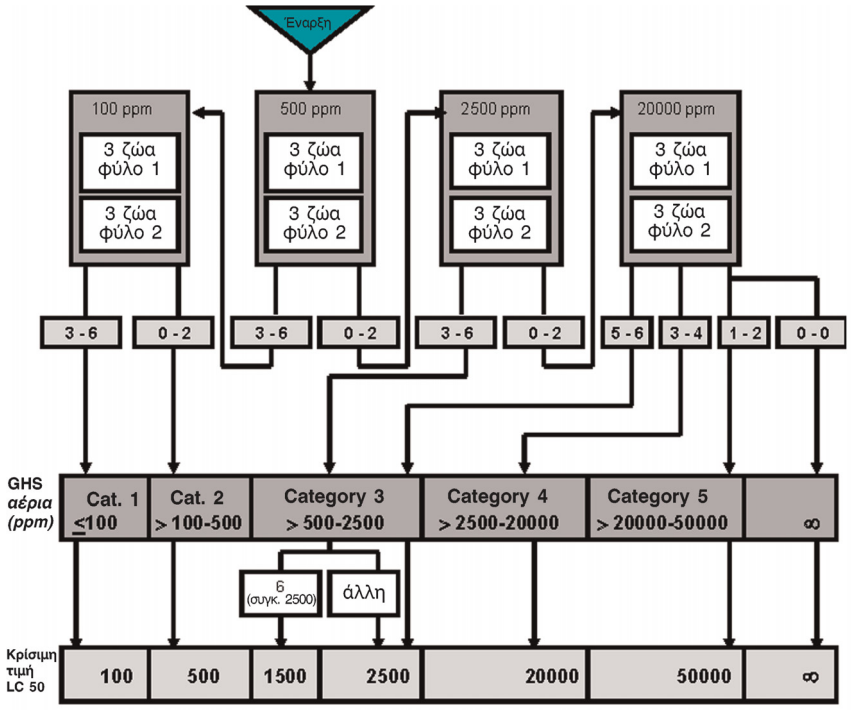
— Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼M4

Προσάρτημα 2β

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 500 ppm/4 ώρες στην περίπτωση αερίων



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

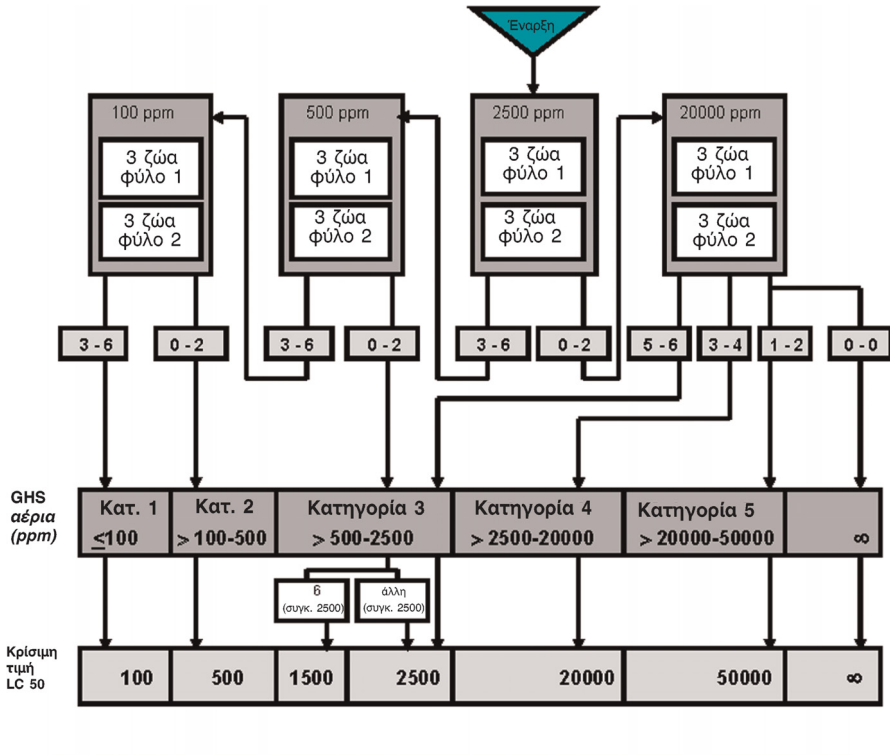
— Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 2γ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 2 500 ppm/4 ώρες στην περίπτωση αερίων



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0–6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

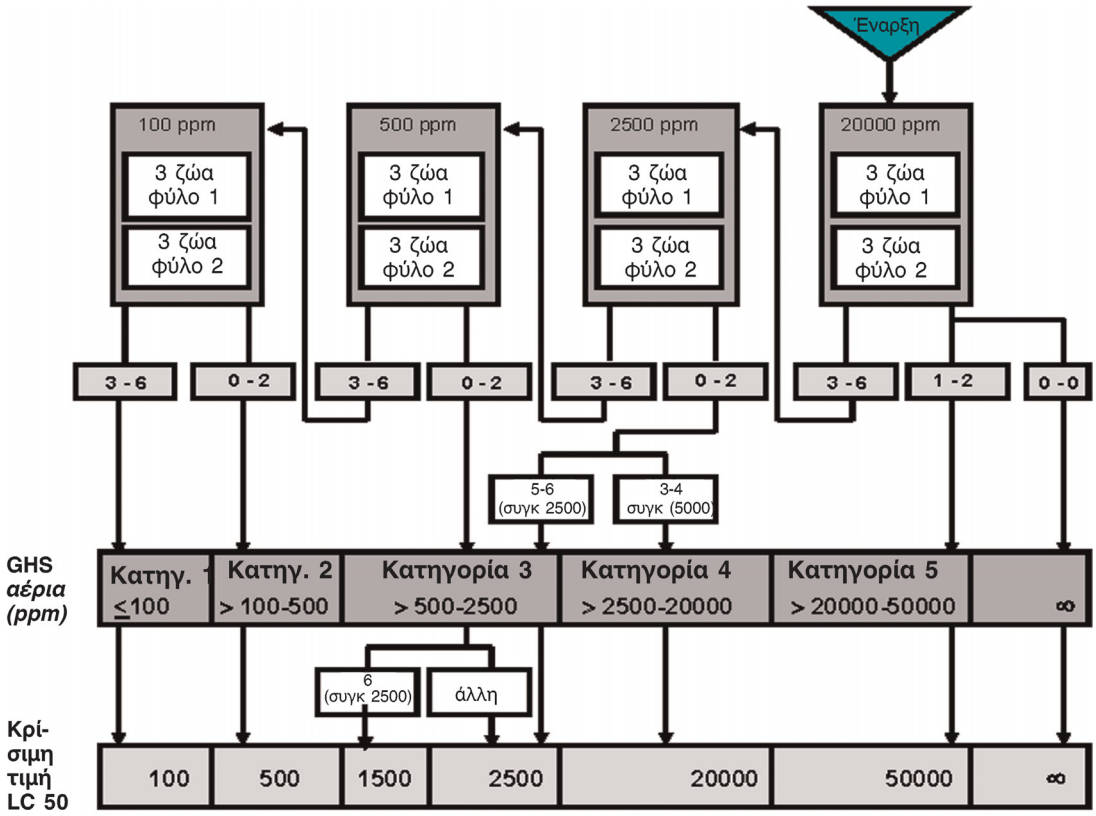
— Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼M4

Προσάρτημα 2δ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 20 000 ppm/4 ώρες στην περίπτωση αερίων



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
— Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 3

Διαδικασία εφαρμοζόμενη για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις στην περίπτωση ατμών (mg/l/4 ώρες)

Γενικές παρατηρήσεις ([1])

Η διαδικασία που ακολουθείται για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις περιγράφεται σχηματικά στα αντίστοιχα διαγράμματα δοκιμής του παρόντος προσαρτήματος.

Προσάρτημα 3α: Η αρχική συγκέντρωση είναι 0,5 mg/l

Προσάρτημα 3β: Η αρχική συγκέντρωση είναι 2,0 mg/l

Προσάρτημα 3γ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 10 mg/l

Προσάρτημα 3δ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 20 mg/l

Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη.

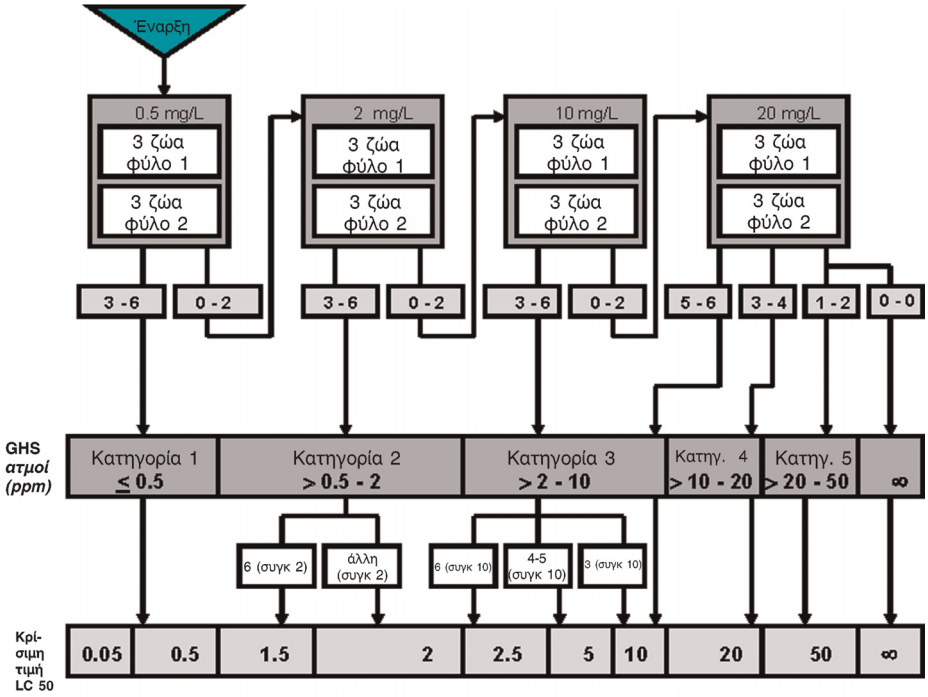
([1]) Στους ακόλουθους πίνακες γίνεται αναφορά στο Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Ουσιών (GHS). Το ισοδύναμο νομοθέτημα της ΕΕ είναι ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008. Στην περίπτωση οξείας αναπνευστικής τοξικότητας, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (9) δεν εφαρμόζεται για την κατηγορία 5.

▼M4

Προσάρτημα 3α

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,5 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

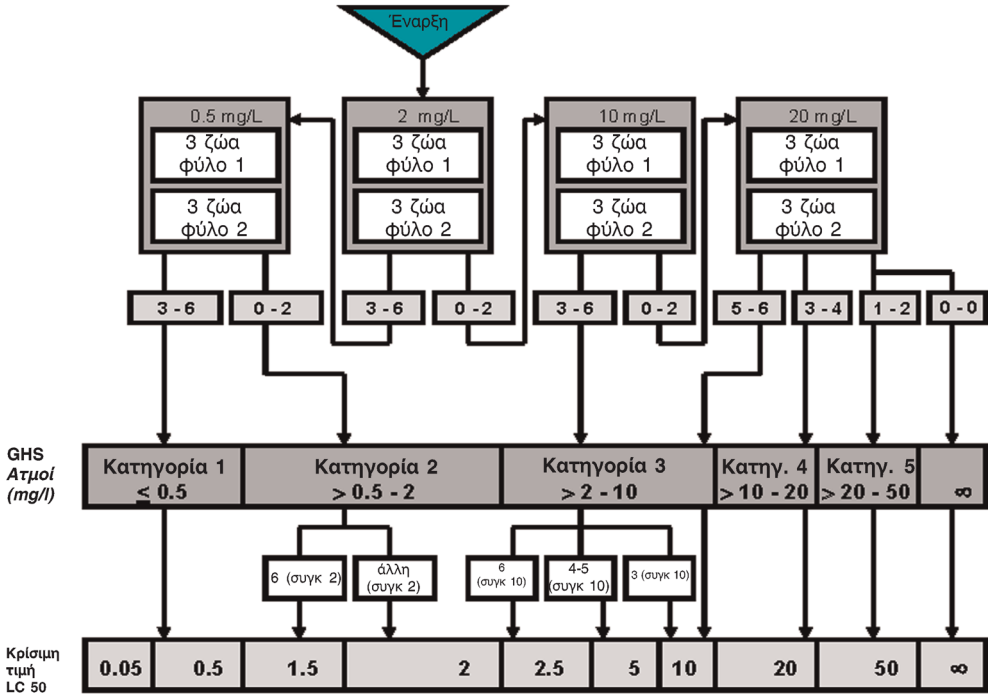
— Δοκιμή με συγκέντρωση 50 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼M4

Προσάρτημα 3β

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 2 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0–6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

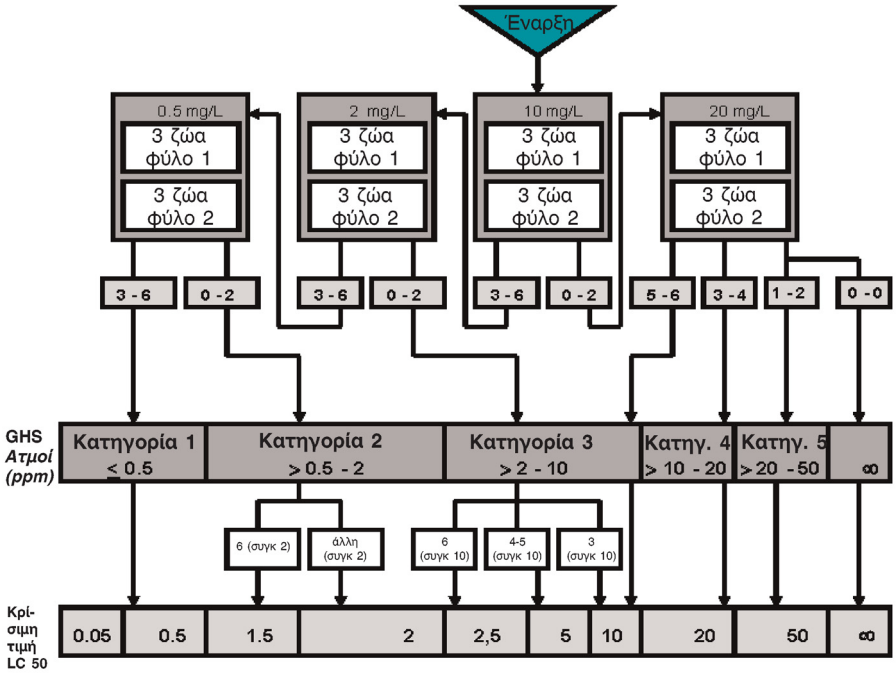
— Δοκιμή με συγκέντρωση 50 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼M4

Προσάρτημα 3γ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 10 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

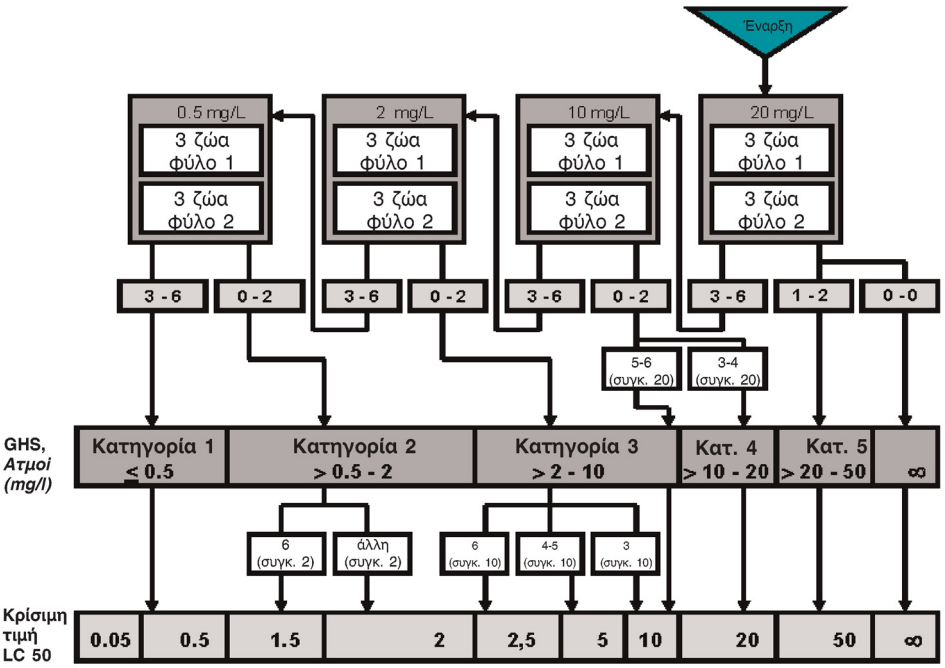
— Δοκιμή με συγκέντρωση 50 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼M4

Προσάρτημα 3δ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 20 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

— Δοκιμή με συγκέντρωση 50 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 4

Διαδικασία εφαρμοζόμενη για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις στην περίπτωση αερολυμάτων (mg/l/4 ώρες)

Γενικές παρατηρήσεις ([1])

Η διαδικασία που ακολουθείται για καθεμία από τις αρχικές συγκεντρώσεις περιγράφεται σχηματικά στα αντίστοιχα διαγράμματα δοκιμής του παρόντος προσαρτήματος.

Προσάρτημα 4α: Η αρχική συγκέντρωση είναι 0,05 mg/l

Προσάρτημα 4β: Η αρχική συγκέντρωση είναι 0,5 mg/l

Προσάρτημα 4γ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 1 mg/l

Προσάρτημα 4δ: Η αρχική συγκέντρωση είναι 5 mg/l

Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη.

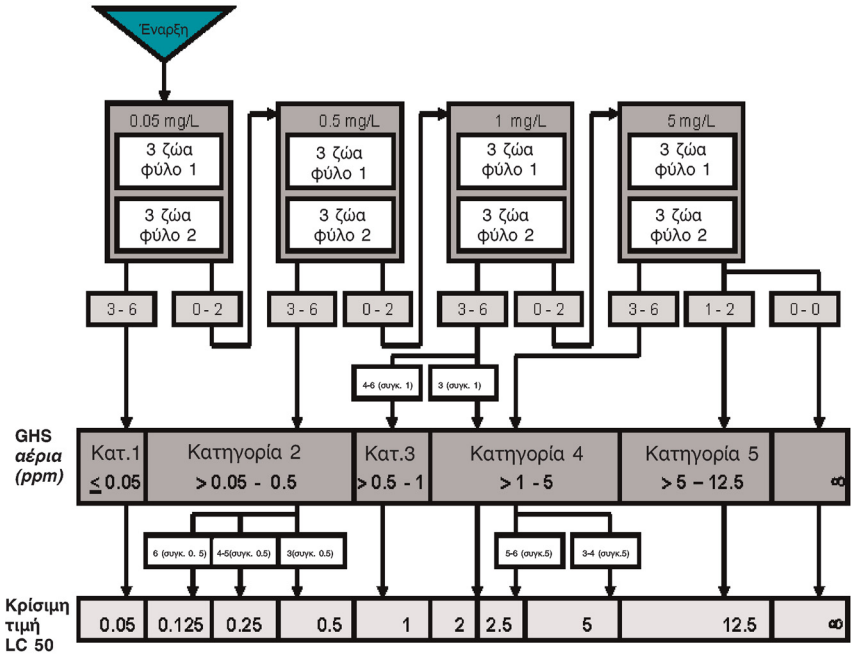
([1]) Στους ακόλουθους πίνακες γίνεται αναφορά στο Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Ουσιών (GHS). Το ισοδύναμο νομοθέτημα της ΕΕ είναι ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008. Στην περίπτωση οξείας αναπνευστικής τοξικότητας, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 (9) δεν εφαρμόζεται για την κατηγορία 5.

▼M4

Προσάρτημα 4α

Οξεία Αναπνευστική Τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,05 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο

— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση

— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης

— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία

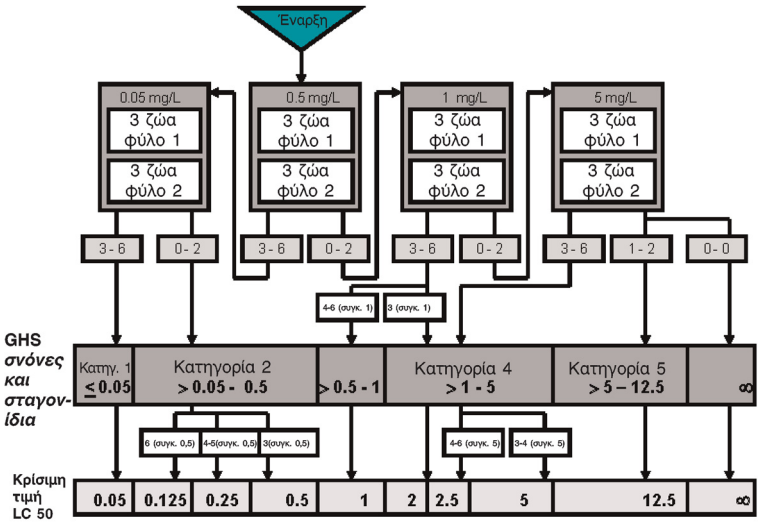
— Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 4β

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,05 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση αερολυμάτων



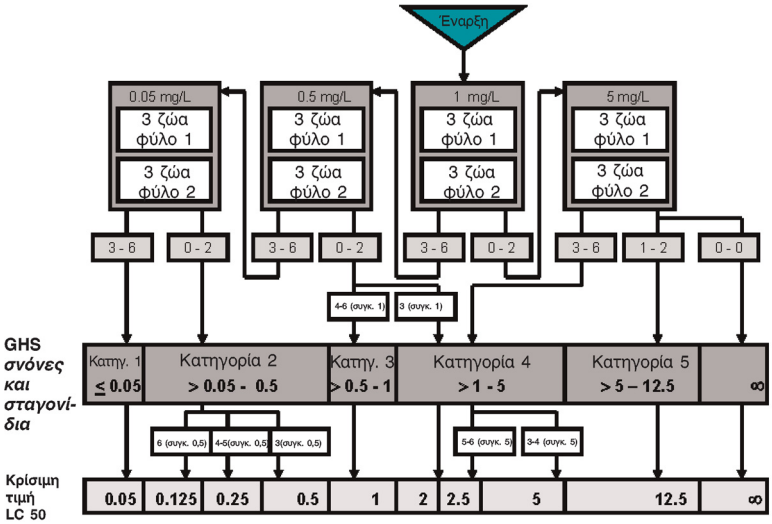
— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
— Δοκιμή με συγκέντρωση 12,5 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 4γ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,05 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση αερολυμάτων



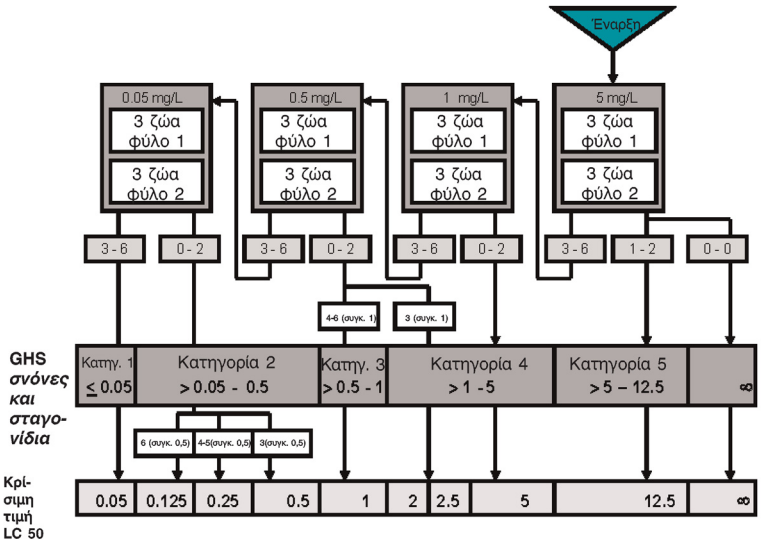
— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
— Δοκιμή με συγκέντρωση 12,5 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

▼**M4**

Προσάρτημα 4δ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,5 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση αερολυμάτων



— 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
— 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
— GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
— ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
— Δοκιμή με συγκέντρωση 12,5 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8»

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΜΕΡΟΣ Γ: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Γ.1. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΨΑΡΙΑ

Γ.2. ΔΟΚΙΜΗ ΟΞΕΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΔΑΦΝΙΑ

Γ.3. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΦΥΚΗ (ΑΛΓΕΣ) ΚΑΙ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΩΝ ΥΔΑΤΩΝ

Γ.4. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΤΗΣ «ΑΜΕΣΗΣ» ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

ΜΕΡΟΣ I. ΓΕΝΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ II. ΔΟΚΙΜΗ ΕΛΑΤΤΩΣΗΣ DOC (Μέθοδος Γ.4-Α)

ΜΕΡΟΣ III. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΗ ΟΟΣΑ (Μέθοδος Γ.4-Β)

ΜΕΡΟΣ IV. ΔΟΚΙΜΗ ΕΚΛΥΣΗΣ CO_2 (Μέθοδος Γ.4-Γ)

ΜΕΡΟΣ V. ΔΟΚΙΜΗ ΜΑΝΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΙΟΜΕΤΡΙΑΣ (Μέθοδος Γ.4-Δ)

ΜΕΡΟΣ VI. ΔΟΚΙΜΗ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ (Μέθοδος Γ.4-Ε)

ΜΕΡΟΣ VII. ΔΟΚΙΜΗ ΜΙΤΙ (Μέθοδος Γ.4-Ζ)

Γ.5. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ — ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΣ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ

Γ.6. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ — ΧΗΜΙΚΩΣ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ

Γ.7. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ — ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ: ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΩΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΤΟΥ pH

Γ.8. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΓΑΙΟΣΚΩΛΗΚΕΣ

Γ.9. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ — ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ZAHN-WELLENS

Γ.10. ΔΟΚΙΜΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΛΥΜΑΤΩΝ: Γ.10-Α: ΜΟΝΑΔΕΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ — Γ.10-Β: ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ

Γ.11. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ — ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΙΛΥΣ: ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΟΗΣ

Γ.12. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ — ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ SCAS

Γ.13. ΒΙΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ: ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΨΑΡΙΑ ΜΕ ΣΥΝΕΧΗ ΡΟΗ ΝΕΡΟΥ

Γ.14. ΔΟΚΙΜΗ ΝΕΑΝΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΨΑΡΙΩΝ

Γ.15. ΨΑΡΙΑ, ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΕΚΙΘΟΦΟΡΑ ΙΧΘΥΔΙΑ (SAC-FRY STAGES)

Γ.16. ΜΕΛΙΣΣΕΣ — ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ

Γ.17. ΜΕΛΙΣΣΕΣ — ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΑΦΗ

Γ.18. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ/ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΚΑΤΑ ΠΑΡΤΙΔΑ

▼**B**

Γ.19.	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ (K_{OC}) ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΑΣΠΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΝΟΜΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)
Γ.20.	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ *DAPHNIA MAGNA*
Γ.21.	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΕΔΑΦΟΥΣ: ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΑΖΩΤΟΥ
Γ.22.	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΕΔΑΦΟΥΣ: ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΑΝΘΡΑΚΑ
Γ.23.	ΑΕΡΟΒΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ
Γ.24.	ΑΕΡΟΒΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΙΖΗΜΑΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
Γ.25.	ΑΕΡΟΒΙΑ ΑΝΟΡΓΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ — ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ
Γ.26.	ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *LEMNA* SP.

▼**M4**

Γ.27.	ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΧΕΙΡΟΝΟΜΙΔΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ- ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ
Γ.28.	ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΧΕΙΡΟΝΟΜΙΔΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ-ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΝΕΡΟΥ
Γ.29.	ΑΜΕΣΗ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ — CO_2 ΣΕ ΣΦΡΑΓΙΣΜΕΝΑ ΔΟΧΕΙΑ (ΔΟΚΙΜΉ ΥΠΕΡΚΕΊΜΕΝΗΣ ΦΆΣΗΣ)
Γ.30.	ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΕ ΧΕΡΣΑΙΟΥΣ ΟΛΙΓΟΧΑΙΤΟΥΣ (OLIGOCHAETA)

▼B

Γ.1. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΨΑΡΙΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της δοκιμής αυτής είναι τα προσδιοριστεί η οξεία θανατηφόρος τοξικότητα μιας ουσίας στα νάρκη στο νερό. Για την εκλογή της πιο κατάλληλης μεθόδου [στατική, ημιστατική ή συνεχούς ροής], που θα εξασφαλίζει ικανοποιητικές σταθερές συγκεντρώσεις της ουσίας κατά τη διάρκεια της δοκιμής, σκόπιμα είναι να έχουμε, όσο το δυνατό, περισσότερες πληροφορίες για την ουσία αυτή όσον αφορά την υδατοδιαλυτότητά της, την τάση ατμών, τη χημική σταθερότητα, τη σταθερά διαστάσεως και τη βιοδιασπασιμότητά της.

Άλλες απαιτούμενες πληροφορίες (π.χ. συντακτικός τύπος, βαθμός καθαρότητας, φύση και περιεκτικότητα σημαντικών ξένων προσμείξεων, παρουσία και ποσότητα προσθέτων, και συντελεστής κατανομής σε n-οκτανόλη/νερά, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και κατά την προετοιμασία της δοκιμής και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΛΔΕΣ

Οξεία τοξικότητα είναι το εμφανές δυσμενές αποτέλεσμα που προκαλείται σε έναν οργανισμό μέσα σε μικρό διάστημα (ημέρες), έκθεσης σε μια ουσία. Σ' αυτή τη δοκιμή, η οξεία τοξικότητα εκφράζεται ως η μέση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC_{50}), που είναι η συγκέντρωση σε νερό, η οποία σκοτώνει 50 % από την ομάδα ψαριών του πειράματος, μέσα σε μια συνεχή περίοδο έκθεσης η οποία πρέπει να δηλώνεται.

Όλες σε συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας δίνονται σε βάρος κατ' όγκο (χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο), καθώς επίσης εκφράζονται και σε βάρος κατά βάρος [$mg.kg^{-l}$].

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Μια ουσία αναφοράς μπορεί να ελέγχεται με σκοπό να αποδειχτεί ότι, κάτω από τις εργαστριακές συνθήκες ελέγχου, η ανταπόκριση των ελεγχόμενων ειδών δεν έχει αλλάξει σημαντικά.

Για τον έλεγχο αυτό δεν καθορίζονται ουσίες αναφοράς.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Είναι δυνατόν να εκτελείται μια οριακή δοκιμή με 100 mg ανά λίτρο, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η LC_{50} είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση αυτή.

Τα ψάρια εκτίθενται στην προστιθέμενη ουσία σε μια ορισμένη περιοχή συγκεντρώσεων για διάστημα 96 ωρών. Καταγράφεται η θνησιμότητα για διαστήματα τουλάχιστον 24 ωρών και όπου είναι δυνατόν, υπολογίζονται σε κάθε παρατήρηση οι συγκεντρώσεις προ έχουν σαν αποτέλεσμα το θάνατο του 50 % των ψαριών [LC_{50}].

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Τα ποιοτικά κριτήρια έχουν εφαρμογή και στην οριακή δοκιμή και στη μέθοδο πλήρους δοκιμής.

Η θνησιμότητα στους ελέγχους δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % (ή το ένα ψάρι, αν χρησιμοποιούνται λιγότερα από δέκα) στο τέλος της δοκιμής.

Η συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου πρέπει καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής να είναι μεγαλύτερη από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα.

▼B

Οι συγκεντρώσεις της εξεταζόμενης ουσίας πρέπει, σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, να διατηρείται στο 80 % των αρχικών συγκεντρώσεων.

Σε ουσίες που διαλύονται εύκολα στο περιβάλλον της δοκιμής, παρέχοντας σταθερά διαλύματα δηλ. εκείνες που δεν εξατμίζονται, αποικοδομούνται, υδρολύονται ή προσροφώνται τουλάχιστον σε σημαντικό βαθμό, η αρχική συγκέντρωση μπορεί να λαμβάνεται σαν ισοδύναμη με την ονομαστική συγκέντρωση. Πρέπει να παρουσιάζονται αποδείξεις ότι οι συγκεντρώσεις διατηρούνται σταθερές σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής και ότι τα ποιοτικά κριτήρια ικανοποιούνται.

Για ουσίες που είναι:

(i) ελάχιστα διαλυτές στο περιβάλλον της δοκιμής,

(ii) ικανές να σχηματίζουν σταθερά γαλακτώματα ή διασπορές,

(iii) μη σταθερές σε υδατικά διαλύματα,

σαν αρχική συγκέντρωση θα λαμβάνεται η συγκέντρωση που μετριέται στο διάλυμα (ή, αν αυτό δεν είναι τεχνικά δυνατό, στη στήλη νερού) στην αρχή της δοκιμής. Η συγκέντρωση θα προσδιορίζεται μετά από μία περίοδο εξισορρόπησης αλλά πριν από την εισαγωγή του εξεταζόμενου ψαριού.

Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, θα πρέπει να γίνονται και άλλες μετρήσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμής για να επιβεβαιώνονται οι πραγματικές συγκεντρώσεις έκθεσης ή ότι τηρούνται τα κριτήρια ποιότητος.

Το pH δεν πρέπει να μεταβάλλεται περισσότερο από 1 μονάδα.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τρεις τύποι μεθόδων μπορεί να χρησιμοποιηθούν:

Στατικός έλεγχος:

Έλεγχος τοξικότητας στον οποίο δεν παρουσιάζεται ροή του διαλύματος ελέγχου. (Τα διαλύματα παραμένουν χωρίς να αλλάζουν καθ' όλη τη διάρκεια του ελέγχου.)

Ημιστατικός έλεγχος:

Έλέγχος χωρίς ροή του διαλύματος ελέγχου, στον οποίο όμως κατά τακτά διαστήματα γίνεται ομαδικά αλλαγή των διαλυμάτων ελέγχου μετά από παρατεταμένες περιόδους (π.χ. 24 ώρες).

Έλεγχος συνεχούς ροής:

Έλεγχος τοξικότητας στον οποίο το νερό στους θαλάμους ελέγχου ανανεώνεται σταθερά, ενώ η ελεγχόμενη χημική ουσία μεταφέρεται με το νερό που χρησιμοποιείται για την ανανέωση του περιβάλλοντος ελέγχου.

1.6.1. **Αντιδραστήρια**

1.6.1.1. *Διαλύματα των ελεγχόμενων ουσιών*

Τα αρχικά διαλύματα της απαιτούμενης συγκέντρωσης παρασκευάζονται με διάλυση της ουσίας σε απιονισμένο νερό ή νερό σύμφωνα με την περιγραφή του σημείου 1.6.1.2.

Οι επιλεγόμενες συγκεντρώσεις για τη δοκιμή, παρασκευάζονται αραιώνοντας το αρχικό διάλυμα. Εάν η δοκιμή αναφέρεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, η ουσία μπορεί να διαλύεται στο νερό αραίωσης απ' ευθείας.

▼B

Οι ουσίες θα πρέπει κανονικά να εξετάζονται μόνο μέχρι το όριο διαλυτότητας. Για ορισμένες ουσίες (π, χ. ουσίες με μικρή υδατοδιαλυτότητα, ή υψηλό P_{ow}, ή εκείνες που σχηματίζουν μία σταθερή διασπορά παρά αληθινό διάλυμα στο νερό), είναι παραδεκτό να διενεργείται και μία δοκιμή με συγκέντρωση πάνω από το όριο διαλυτότητας της ουσίας για να διασφαλίζεται ότι επιτεύχθηκε πράγματι η μέγιστη διαλυτή/σταθερή συγκέντρωση. Είναι εντούτοις σημαντικό, η συγκέντρωση αυτή να μην παρενοχλεί διαφορετικά το σύστημα δοκιμής (π.χ. δημιουργία μιας μεμβράνης της ουσίας στην επιφάνεια του νερού εμποδίζοντας έτσι την οξυγόνωση του νερού, κ.λπ.).

Για να υποβοηθηθεί η παρασκευή των αρχικών διαλυμάτων ουσιών με μικρή υδατοδιαλυτότητα ή η διασπορά των ουσιών αυτών στο περιβάλλον δοκιμής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν υπέρηχοι για την υποβοήθηση της διασποράς, οργανικοί διαλύτες, γαλακτωματοποιητές ή μέσα διασποράς. Όταν χρησιμοποιούνται οι βοηθητικές αυτές ουσίες, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να περιέχουν την ίδια ποσότητα βοηθητικής ουσίας, ενώ επιπλέον ψάρια μάρτυρες θα πρέπει να εκτίθενται στην ίδια συγκέντρωση βοηθητικής ουσίας με εκείνη που χρησιμοποιείται στη σειρά των δοκιμών. Η συγκέντρωση αυτών των βοηθητικών ουσιών θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη και σε καμία περίπτωση να μην υπερβαίνει τα 100 mg ανά λίτρο στο περιβάλλον δοκιμής.

Η δοκιμή θα πρέπει να πραγματοποιείται χωρίς ρύθμιση του pH. Αν υπάρχει ένδειξη αξιοσημείωτης μεταβολής του pH, συνιστάται η δοκιμή να επαναλαμβάνεται με ρύθμιση του pH και να αναφέρονται τα αποτελέσματα. Στην περίπτωση αυτή, η τιμή pH του αρχικού διαλύματος θα πρέπει να ρυθμίζεται στην τιμή pH του νερού αραίωσης, εκτός αν υπάρχουν ειδικοί λόγοι που δεν το επιτρέπουν. Για το σκοπό αυτό προτιμούνται το HCl και NaOH. Η ρύθμιση του pH θα πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας στο αρχικό διάλυμα να μη μεταβάλλεται τουλάχιστον σημαντικά. Εάν εξαιτίας της ρύθμισης του pH προκληθεί κάποια χημική αντίδραση ή φυσική καθίζηση της εξεταζόμενης ουσίας, αυτή πρέπει να αναφέρεται.

1.6.1.2. *Νερό συντήρησης και αραίωσης*

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί πόσιμο νερό του δικτύου ύδρευσης (απαλλαγμένο από επικίνδυνες ενδεχομένως συγκεντρώσεις χλωρίου, βαρέων μετάλλων ή άλλων ουσιών), καλής ποιότητας φυσικό νερό ή νερό από ανασύσταση (βλέπε Προσάρτημα Ι). Πρέπει να προτιμώνται νερά με ολική σκληρότητα μεταξύ 10 και 250 mg ανά λίτρο (όπως $CaC0_3$) και από pH 6,0 έως 8,5.

1.6.2. **Συσκευή**

Όλες οι συσκευές πρέπει να είναι φτιαγμένες από χημικά αδρανές υλικό:

— αυτόματο σύστημα αραίωσης (για τον έλεγχο συνεχούς ροής),

— μετρητή οξυγόνου,

— συσκευή προσδιορισμού της σκληρότητας του νερού,

— κατάλληλα όργανα για τον έλεγχο της θερμοκρασίας,

— πεχάμετρο.

1.6.3. **Ψάρια ελέγχου**

Τα ψάρια θα πρέπει να είναι υγιή και χωρίς καμία εμφανή δυσμορφία.

▼B

Τα χρησιμοποιούμενα είδη θα πρέπει να επιλέγονται με βάση πρακτικά κριτήρια, όπως το αν ανευρίσκονται εύκολα σε όλη τη διάρκεια του χρόνου, την εύκολη συντήρηση, την καταλληλότητά για τη δοκιμή, τη σχετική ευαισθησία ως πρός τίς χημικές ουσίες, και οποιοδήποτε άλλο οικονομικό, βιολογικό ή οικολογικό παράγοντα που έχει σχέση με το θέμα. Κατά την επιλογή του είδους των ψαριών θα πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη και η ανάγκη συγκρισιμότητας των λαμβανομένων στοιχείων και η υπάρχουσα διεθνής εναρμόνιση (παραπομπή 1).

Ένας πίνακας ειδών που συνιστώνται για την εκτέλεση της δοκιμής αυτής υπάρχει στο προσάρτημα 2 προτιμούνται η πέστροφα και το είδος Ζέμπρα.

1.6.3.1. *Συντήρηση ψαριών*

Τα ψάρια ελέγχου προέρχονται, κατά προτίμηση, από μία ποσότητα με παρόμοιο μάκρος και ηλικία. Τα ψάρια πρέπει να κρατηθούν για 12 ημέρες τουλάχιστον στις παρακάτω συνθήκες:

Φορτίο:

Ανάλογο με το σύστημα (ανακυκλοφορία ή συνεχής ροή) και το είδος των ψαριών.

Νερό:

Βλέπε σημείο 1.6.1.2.

Φως:

Περίοδος φωτισμού 12 έως 16 ώρες ημερήσια.

Συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου:

80 % τουλάχιστον της τιμής κορεσμού με αέρα.

Διατροφή:

Τρεις φορές την εβδομάδα ή καθημερινά που σταματά 24 ώρες πριν αρχίσει ο έλεγχος.

1.6.3.2. *Θνησιμότητα*

Μετά από μια περίοδο εγκατάστασης 48 ωρών, καταγράφονται οι θάνατοι και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

— για θνησιμότητα μεγαλύτερη του 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες:

  απορρίπτεται όλη η ομάδα,

— για θνησιμότητα μεταξύ 5 έως 10 % του πληθυσμού:

  η περίοδος συντήρησης συνεχίζεται για επτά ακόμη ημέρες.

  Αν δεν παρατηρηθούν άλλοι θάνατοι, η ομάδα ψαριών εγκρίνεται, αλλιώς πρέπει να απορριφθεί,

— για θνησιμότητα μικρότερη του 5 % του πληθυσμού:

  η ομάδα ψαριών εγκρίνεται.

1.6.4. **Προσαρμογή**

Όλα τα ψάρια πρέπει να εκτεθούν σε νερό της ποιότητας και θερμοκρασίας που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στον έλεγχο για επτά τουλάχιστον ημέρες πριν να χρησιμοποιηθούν.

▼B

1.6.5. **Διαδικασία ελέγχου**

Ένας προκαταρκτικός έλεγχος μπορεί να προηγηθεί του τελικού, με σκοπό την παροχή πληροφοριών για την περιοχή των συγκεντρώσεων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στον κυρίως έλεγχο.

Εκτός από τη σειρά των δοκιμών, διενεργείται και ένας έλεγχος χωρίς την εξεταζόμενη ουσία και, εφόσον συντρέχει λόγος, και ένας έλεγχος με την βοηθητική ουσία.

Ανάλογα με τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της εξεταζόμενης ουσίας, θα πρέπει να επιλέγεται ο στατικός, ημιστατικός ή συνεχούς ροής έλεγχος ώστε να πληρούνται τα ποιοτικά κριτήρια.

Τα ψάρια εκτίθενται στην ουσία όπως περιγράφεται παρακάτω:

— Διάρκεια: 96 ώρες

— Αριθμός ζώων: τουλάχιστον 7 για κάθε συγκέντρωση,

— Δεξαμενές: κατάλληλης χωρητικότητας σε σχέση με το φορτίο που συνιστάται,

— Φορτίο: το μέγιστο φορτίο που συνιστάται είναι 1,0 g ανά λίτρο για τον στατικό και ημιστατικό έλεγχο για συστήματα συνεχούς ροής γίνονται αποδεκτές υψηλότερες συγκεντρώσεις,

— Συγκεντρώσεις ελέγχου: πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεις που διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα σταθερό παράγοντα που δεν υπερβαίνει το 2,2 και που καλύπτουν κατά το δυνατόν την περιοχή θνησιμότητας από 0 έως 100 %,

— Νερό: βλέπε σημείο 1.6.1.2.,

— Φως: περίοδος φωτισμού 12 έως 16 ώρες ημερησίως,

— Θερμοκρασία: κατάλληλη για τα είδη ψαριών (προσάρτημα 2) αλλά με προσέγγιση ± 1 °C για κάθε ιδιαίτερο έλεγχο,

— Συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου: όχι λιγότερο από 60 % της τιμή; κορεσμού με αέρα στη θερμοκρασία που έχει επιλεγεί,

— Διατροφή: καθόλου.

Τα ψάρια επιθεωρούνται μετά τις πρώτες 2 έως 4 ώρες και σε διαστήματα 24 ωρών τουλάχιστον. Τα ψάρια θεωρούνται νεκρά όταν άγγιγμα του ουραίου μίσχου δεν προκαλεί αντίδραση και δεν είναι ορατές αναπνευστικές κινήσεις. Τα νεκρά ψάρια απομακρύνονται όταν παρατηρηθούν και οι θάνατοι καταγράφονται. Κρατούνται σημειώσεις των ορατών ανωμαλιών (π.χ. απώλεια ισορροπίας, αλλαγές συμπεριφοράς στην κολύμβηση, αναπνευστική λειτουργία, χρωματισμός κ.λπ.).

Μετρήσεις του pH, του διαλελυμένου οξυγόνου και της θερμοκρασίας πρέπει να γίνονται καθημερινά.

Οριακή δοκιμασία

Χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται σ' αυτή τη μέθοδο δοκιμής, μπορεί να εκτελεσθεί μία οριακή δοκιμή με 100 mg ανά λίτρο για να διαπιστωθεί αν η LC_{50} είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση αυτή.

Αν η φύση της ουσίας είναι τέτοια ώστε να μην μπορεί να επιτευχθεί στο νερό της δοκιμής συγκέντρωση 100 mg ανά λίτρο, η οριακή δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται με συγκέντρωση ίση με τη διαλυτότητα της ουσίας (ή τη μέγιστη συγκέντρωση που οδηγεί σε μια σταθερή διασπορά) στο χρησιμοποιούμενο μέσον (βλ. επίσης 1.6.1.1.).

▼B

Η οριακή δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται χρησιμοποιώντας 7 έως 10 ψάρια, με τον ίδιο αριθμό και στον ή στις ομάδες μαρτύρων. (Η διωνυμική θεωρία υπαγορεύει ότι όταν χρησιμοποιούνται 10 ψάρια με θνησιμότητα μηδέν, υπάρχει μία τιμή 99,9 % εμπιστοσύνης ότι η LC_{50} είναι μεγαλύτερη από τη χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση στην οριακή δοκιμή. Με 7, 8 ή 9 ψάρια, η απουσία θνησιμότητας παρέχει μία τιμή 99 %, τουλάχιστον, εμπιστοσύνης ότι η LC_{50} είναι μεγαλύτερη από τη χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση.)

Εάν υφίσταται θνησιμότητα, πρέπει να εκτελεσθεί πλήρης μελέτη. Εάν παρατηρηθούν υποθανατηφόρες επιδράσεις, θα πρέπει να καταγραφούν.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Για κάθε περίοδο για την οποία καταγράφηκαν παρατηρήσεις (24, 48, 72 και 96 ώρες), χαράσσεται καμπύλη ποσοστού θνησιμότητας για κάθε συνιστώμενη περίοδο έκθεσης σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης σε λογαριθμικό χαρτί.

Όπου είναι δυνατόν και για κάθε χρόνο παρατήρησης, θα πρέπει να εκτιμώνται η LC_{50} και τα όρια εμπιστοσύνης ($\rho = 0,05$) χρησιμοποιώντας πρότυπες διαδικασίες οι τιμές αυτές θα πρέπει να στρογγυλοποιούνται σε ένα, ή το πολύ δύο σημαντικά ψηφία (παραδείγματα στρογγυλοποίησης σε δύο ψηφία: 170 για 173,5, 0,13 αντί 0,127, 1,2 αντί 1,21).

Στις περιπτώσεις όπου η κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης/ποσοστού απόκρισης είναι πολύ μεγάλη για να μπορεί να υπολογισθεί η LC_{50}, είναι αρκετή η γραφική εκτίμηση της τιμής αυτής.

Όταν δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις, με σχέση 2,2 δίνουν μόνο 0 και 100 % θνησιμότητα, οι δύο αυτές τιμές αρκούν για να υποδείξουν την περιοχή στην οποία ευρίσκεται η LC_{50}.

Αν παρατηρηθεί ότι η σταθερότητα ή η ομοιογένεια της εξεταζόμενης ουσίας δεν μπορεί να διατηρηθεί, το γεγονός αυτό θα πρέπει να αναφέρεται και να λαμβάνεται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

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

— πληροφορίες για το εξεταζόμενο ψάρι (επιστημονική ονομασία, γένος, προμηθευτή, κάθε τυχόν προκατεργα-σία, μέγεθος και αριθμό ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε συγκέντρωση)·

— πηγή νερού αραίωσης και κυριώτερα χημικά χαρακτηριστικά (pH, σκληρότητα, θερμοκρασία)·

— στην περίπτωση ουσίας με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, τη μέθοδο παρασκευής του αρχικού και του διαλύματος δοκιμής

— συγκέντρωση κάθε βοηθητικής ουσίας

— πίνακα των χρησιμοποιηθεισών συγκεντρώσεων και κάθε διαθέσιμη πληροφορία για τη σταθερότητα των συγκεντρώσεων της εξεταζόμενης ουσίας στο διάλυμα δοκιμής

— αν εκτελούνται χημικές αναλύσεις, τις χρησιμοποιηθείσες μεθόδους και τα ληφθέντα αποτελέσματα·

— αποτελέσματα τυχόν οριακής δοκιμασίας, αν έγινε·

— τους λόγους της εκλογής και λεπτομέρειες για τη χρησιμοποιηθείσα διαδικασία ελέγχου (π.χ. στατικός, ημιστατικός, ταχύτητα χορήγησης, ταχύτητα ροής, αν υπήρχε εξαερισμός, φορτίο ψαριών, κ.λπ)·

▼B

— περιγραφή του εξοπλισμού ελέγχου·

— πρόγραμμα φωτισμού·

— συγκεντρώσεις διαλελυμένου οξυγόνου, τιμές pH και θερμοκρασίες των διαλυμάτων δοκιμής κάθε 24 ώρες·

— αποδείξεις τήρησης των ποιοτικών κριτηρίων·

— πίνακα με τη συνολική θνησιμότητα σε κάθε συγκέντρωση και στο μάρτυρα (και μάρτυρα με τη βοηθητική ουσία, αν απαιτείται) σε κάθε χρονική στιγμή των παρατηρήσεων·

— γραφική παράσταση της καμπύλης συγκέντρωσης/ποσοστού απόκρισης στο τέλος της δοκιμής·

— εάν είναι δυνατόν, τις τιμές LC_{50} σε κάθε συνιστώμενο χρόνο παρατήρησης (με όριο εμπιστοσύνης 95 %)·

— στατιστικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των τιμών LC_{50}·

— αν χρησιμοποιήθηκε ουσία αναφοράς, τα ληφθέντα αποτελέσματα·

— μέγιστη τιμή συγκέντρωσης που δεν προκαλεί θνησιμότητα στη διάρκεια της δοκιμής·

— χαμηλότερη τιμή συγκέντρωσης στη δοκιμή που προκαλεί 100 % θνησιμότητα στη διάρκεια της δοκιμής.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae).* Parti: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenossisches Department des Innern, Schweiz; Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasserunter-suchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvenebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikolo-gie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer programm for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Προσάρτημα 1

Νερό από ανασύσταση

Παράδειγμα ενός κατάλληλου νερού αραίωσης

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικού βαθμού.

Το νερό πρέπει να είναι καλής ποιότητας απεσταγμένο νερό ή απιονισμένο νερό με αγωγιμότητα μικρότερη από 5 μScm^{-1}.

Η συσκευή απόσταξης του νερού δεν πρέπει να περιέχει κανένα κομμάτι κατασκευασμένο από χαλκό.

Αρχικό διάλυμα

$CaCl_2$. $2H_20$ (υδροχλωριούχο ασβέστιο)	11,76 g
διαλύονται σε νερό και συμπληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο	
$MgS0_4$. $7H_20$ (επτα-υδροθειικό μαγνήσιο)	4,93 g
διαλύονται σε νερό και συμπληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο	
$NaHCO_3$ (όξινο ανθρακικό νάτριο)	2,59 g
διαλύονται σε νερό και συμληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο	
KCl (χλωριούχο κάλιο)	0,23 g
διαλύονται σε νερό και συμπληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο	

Νερό αραίωσης από ανασύσταση

Αναμειγνύονται 25 ml από κάθε ένα από τα τέσσερα αρχικά διαλύματα και συμπληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο.

Αερίζεται μέχρις ότου η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου εξισωθεί με την τιμή κορεσμού με αέρα.

Το pH πρέπει να είναι 7,8 ± 0,2

Το pH διορθώνεται αν είναι ανάγκη με NaOH (καυστικό νάτριο) ή HC1 (υδροχλωρικό οξύ).

Το νερό αραίωσης που παρασκευάζεται έτσι αφήνεται για 12 ώρες περίπου και δεν χρειάζεται περαιτέρω αερισμό.

Το σύνολο των ιόντων Ca και Mg σ' αυτό το διάλυμα είναι 2,5 mmol/l. Η σχέση των ιόντων Ca:Mg ειναι 4:1 και του Na: K είναι 10:1. Η συνολική αλκαλικάτητα του διαλύματος είναι 0,8 mmol/l.

Οποιαδήποτε εκτροπή στην παρασκευή του νερού αραίωσης δεν πρέπει να αλλάζει τη σύσταση ή τις ιδιότητες του νερού.

▼B

Προσάρτημα 2

Είδη ψαριών που συνιστώνται για δοκιμασία

Είδη που συνιστώνται	Περιοχή θερμοκρασιών ελέγχου που συνιστώνται (°C)	Ολικό μήκος ζώων ελέγχου (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprintdaej (Hamilton-Buchanan) Zebra-fish	20 to 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafi-nesque) Fathead minnow	20 to 24	5,0 ± 2,0
Cypnnus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758} Common carp	20 to 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae Cyprinodontidae) (Tomminck and Schiegel 1850) Red killifish	20 to 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 to 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarcbidae) (Rafi-nesque Linneaus 1758) Bluegill	20 to 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Wal-baum 1988) Rainbow trout	12 to 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Golden orfe	20 to 24	6,0 ± 2,0

Συλλογή

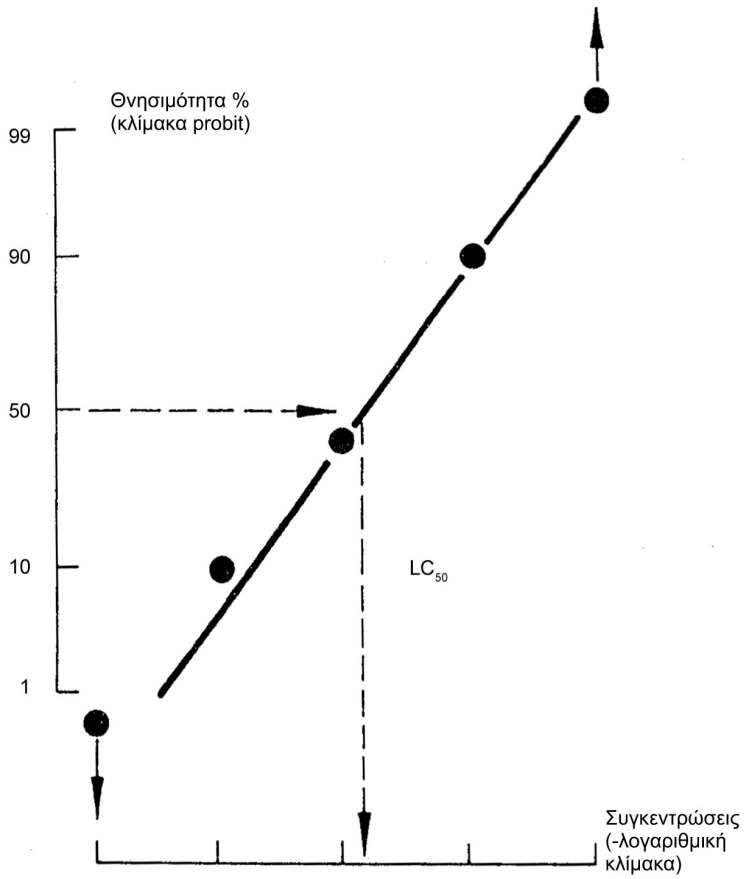
Τα ψάρια που αναφέρονται παραπάνω εκτρέφονται εύκολα ή/και είναι ευρέως διαθέσιμα κατά τη διάρκεια του χρόνου. Είναι δυνατό να τραφούν και καλλιεργηθούν είτε σε ιχθυοτροφεία είτε στο εργαστήριο, με συνθήκες ελεγχόμενες για παθήσεις και παράσιτα, έτσι που τα ζώα ελέγχου να είναι υγιή και από γνωστή καταγωγή. Αυτά τα ψάρια είναι διαθέσιμα σε πολλά μέρη του κόσμου.

▼B

Προσάρτημα 3

Παράδειγμα συγκέντρωσης: εκατοστιαία θνησιμότητα

Παράδειγμα προσδιορισμού LC_{50} με χαρτί log-probit



▼B

Γ.2. ΔΟΚΙΜΗ ΟΞΕΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΔΑΦΝΙΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών οξείας ακινητοποίησης είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 202 (2004) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα μέθοδο περιγράφεται δοκιμή οξείας τοξικότητας για την αξιολόγηση των επιδράσεων χημικών ουσιών σε ζώα της οικογένειας των δαφνιίδων. Χρησιμοποιήθηκαν στο μέτρο του δυνατού υφιστάμενες μέθοδοι δοκιμών (1)(2)(3).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΊ

Στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

EC_{50}: η συγκέντρωση που υπολογίζεται ότι ακινητοποιεί το 50 % των δαφνιίδων κατά τη δηλούμενη περίοδο έκθεσης. Εάν χρησιμοποιείται διαφορετικός ορισμός, αυτό πρέπει να αναφέρεται, με τη σχετική βιβλιογραφική παραπομπή.

Ακινητοποίηση: τα ζώα που δεν μπορούν να κολυμπήσουν μέσα σε 15 δευτερόλεπτα μετά από ήπια ανακίνηση του δοχείου ελέγχου, θεωρούνται ακινητοποιημένα (έστω και αν μπορούν ακόμη να κινούν τις κεραίες τους).

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Νεαρά άτομα της οικογένειας των δαφνιίδων, ηλικίας κάτω των 24 ωρών κατά την έναρξη της δοκιμής, εκτίθενται σε σειρά συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας για 48 ώρες. Καταγράφεται η ακινητοποίηση στις 24 και 48 ώρες και συγκρίνεται με τιμές μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αναλύονται για τον υπολογισμό της EC_{50} στις 48ώρες (βλ. ορισμούς στην ενότητα 1.2). Ο προσδιορισμός της EC_{50} στις 24 ώρες είναι προαιρετικός.

1.4. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Θα πρέπει να είναι γνωστές η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της ελεγχόμενης ουσίας και να υπάρχει αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στα διαλύματα ελέγχου, μέθοδος της οποίας έχουν αναφερθεί η απόδοση ανάκτησης και το όριο προσδιορισμού. Χρήσιμες πληροφορίες είναι, μεταξύ άλλων, ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η σταθερότητα στο νερό ή στο φως, ο συντελεστής κατανομής σε μίγμα n-οκτανόλης/νερού (P_{ow}) και τα αποτελέσματα δοκιμής άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας (βλ. μέθοδο Γ.4).

ΣΗΜ.: Κατευθύνσεις για τον έλεγχο ουσιών που οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες δυσχεραίνουν τον έλεγχό τους, παρέχονται στη δημοσίευση (4).

1.5. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για να εξακριβωθεί η αξιοπιστία των συνθηκών δοκιμής, είναι δυνατόν να υποβληθεί σε δοκιμή για EC_{50} μια ουσία αναφοράς. Για το σκοπό αυτό, συνιστώνται οι τοξικές ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε διεθνείς κυκλικές δοκιμές (ring tests) (1)(5) ([1]). Η/Οι δοκιμή/-ές με ουσία αναφοράς θα πρέπει να εκτελείται/-ούνται κατά προτίμηση μηνιαίως και τουλάχιστον ανά εξάμηνο.

([1]) Από τα αποτελέσματα των εν λόγω διεργαστηριακών δοκιμών και από ένα τεχνικό διορθωτικό στο πρότυπο ISO 6341 προκύπτει πεδίο τιμών EC_{50} στις 24 ώρες για το διχρωμικό κάλιο ($K_2Cr_2O_7$) 0,6 mg/l έως 1,7 mg/l.

▼B

1.6. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Για να είναι έγκυρη μια δοκιμή, εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια επιδόσεων:

— η ακινητοποίηση στους μάρτυρες, συμπεριλαμβανομένου εκείνου που περιέχει το διαλυτικό μέσο, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % των δαφνιίδων,

— η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο τέλος της δοκιμής πρέπει να είναι ≥ 3 mg/l, τόσο στα δοχεία μάρτυρες όσο και στα δοχεία ελέγχου.

ΣΗΜ: Όσον αφορά το πρώτο κριτήριο, δεν πρέπει να διαπιστώνονται σε περισσότερο από 10 % των δαφνιίδων μαρτύρων ακινητοποίηση ή άλλα σημεία ασθένειας ή πίεσης, π.χ. αποχρωματισμός, ασυνήθης συμπεριφορά, όπως παγίδευση στην επιφάνεια του νερού.

1.7. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.7.1. **Εργαστηριακά σκεύη και όργανα**

Τα δοχεία ελέγχου και τα υπόλοιπα σκεύη που πρόκειται να έλθουν σε επαφή με τα διαλύματα ελέγχου πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα δοχεία ελέγχου είναι κατά κανόνα γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες ή ποτήρια ζέσεως και θα πρέπει να καθαρίζονται με πρότυπες εργαστηριακές διαδικασίες, πριν από κάθε χρήση. Τα δοχεία ελέγχου θα πρέπει να πωματίζονται χαλαρά, ώστε να περιορίζεται η απώλεια νερού λόγω εξάτμισης και να μην εισέρχεται σκόνη στα διαλύματα. Οι πτητικές ενώσεις θα πρέπει να ελέγχονται σε τελείως πλήρη, κλειστά δοχεία, αρκετά μεγάλα ώστε να μην παρατηρηθεί μείωση ή έλλειψη οξυγόνου (βλ. ενότητα 1.6 και σημείο 1.8.3 πρώτο εδάφιο).

Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ορισμένα από τα ακόλουθα όργανα ή και όλα: μετρητής οξυγόνου (με μικροηλεκτρόδιο ή άλλη κατάλληλη διάταξη για τη μέτρηση του διαλυμένου οξυγόνου σε δείγματα μικρού όγκου), πεχάμετρο, κατάλληλο όργανο για τον έλεγχο της θερμοκρασίας, εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολικού οργανικού άνθρακα (TOC), εξοπλισμός για τον προσδιορισμό του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD), εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας του νερού κ.λπ..

1.7.2. **Ελεγχόμενος οργανισμός**

Προτιμάται το είδος *Daphnia magna* Straus, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα κατάλληλα είδη δαφνίας (π.χ. *Daphnia pulex*). Τα ζώα θα πρέπει να είναι ηλικίας κάτω των 24 ωρών κατά την έναρξη της δοκιμής και, για να περιορίζεται η διακύμανση, συνιστάται ένθερμα να μην είναι απόγονοι πρώτης γενεάς. Θα πρέπει να προέρχονται από υγιείς μητρικούς οργανισμούς (δηλ. που δεν δείχνουν σημεία πίεσης, όπως υψηλή θνησιμότητα, παρουσία αρσενικών ατόμων και εφιππίων, καθυστέρηση στη γέννηση της πρώτης γενεάς απογόνων, αποχρωματισμό ζώων κ.λπ.). Όλοι οι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται για μια συγκεκριμένη δοκιμή θα πρέπει να προέρχονται από καλλιέργειες των ίδιων μητρικών δαφνιίδων. Τα μητρικά ζώα πρέπει να διατηρούνται σε συνθήκες καλλιέργειας (φως, θερμοκρασία, θρεπτικό υλικό) ανάλογες με εκείνες που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή. Εάν το θρεπτικό υλικό για δαφνιίδες που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή διαφέρει από εκείνο που χρησιμοποιείται στην καθημερινή πρακτική για τις καλλιέργειες δαφνιίδων, είναι ορθή πρακτική να προβλέπεται και περίοδος εγκλιματισμού πριν από τη δοκιμή. Για τον σκοπό αυτό, οι απόγονοι δαφνιίδες θα πρέπει να διατηρούνται σε νερό αραίωσης στη θερμοκρασία της δοκιμής τουλάχιστον για 48 ώρες πριν από την έναρξή της.

▼B

1.7.3. **Νερό διατήρησης και αραίωσης**

Είναι αποδεκτό ως νερό διατήρησης και αραίωσης το φυσικό νερό (επιφανειακά ή υπόγεια ύδατα), το νερό από ανασύσταση ή το αποχλωριωμένο νερό του δικτύου, εάν οι δαφνίδες επιβιώνουν σε αυτό κατά τη διάρκεια των περιόδων καλλιέργειας, εγκλιματισμού και δοκιμής, χωρίς να εμφανίσουν σημεία πίεσης. Οποιοδήποτε νερό ανταποκρίνεται στα χημικά χαρακτηριστικά του αποδεκτού νερού αραίωσης, που παρατίθενται στο παράρτημα 1, είναι κατάλληλο ως νερό ελέγχου. Η ποιότητά του θα πρέπει να παραμένει σταθερή στη διάρκεια της δοκιμής. Νερό από ανασύσταση μπορεί να παρασκευαστεί με την προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων αντιδραστηρίων αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας σε απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό. Παραδείγματα νερού από ανασύσταση παρέχονται στις δημοσιεύσεις (1) και (6) και στο παράρτημα 2. Σημειωτέον ότι τα θρεπτικά υλικά που περιέχουν γνωστούς παράγοντες χηλικής συμπλοκοποίησης, όπως τα M4 και M7 που περιγράφονται στο παράρτημα 2, θα πρέπει να αποφεύγονται στην περίπτωση του ελέγχου ουσιών που περιέχουν μέταλλα. Το pH θα πρέπει να κυμαίνεται από 6 έως 9. Για τη *Daphnia magna* συνιστάται σκληρότητα μεταξύ 140 και 250 mg/l (ως $CaCO_3$), ενώ για άλλα είδη δαφνίας μπορεί να ενδείκνυνται χαμηλότερες τιμές σκληρότητας. Το νερό αραίωσης μπορεί να αερίζεται πριν χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμή, ώστε η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου να φθάσει το σημείο κορεσμού.

Εάν χρησιμοποιείται φυσικό νερό, οι ποιοτικές παράμετροι θα πρέπει να μετριούνται τουλάχιστον ανά εξάμηνο ή όποτε υπάρχουν υπόνοιες ότι τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να έχουν μεταβληθεί σημαντικά (βλ. προηγούμενο εδάφιο και παράρτημα 1). Θα πρέπει επίσης να εκτελούνται μετρήσεις των βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Εάν χρησιμοποιείται αποχλωριωμένο νερό του δικτύου, είναι σκόπιμο να εκτελείται καθημερινά ανάλυση χλωρίου. Εάν το νερό αραίωσης προέρχεται από πηγή επιφανειακών ή υπογείων υδάτων, θα πρέπει να μετριούνται η αγωγιμότητα και ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) ή το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD).

1.7.4. **Διαλύματα ελέγχου**

Τα διαλύματα ελέγχου με τις επιλεγμένες συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση μητρικού διαλύματος. Τα μητρικά διαλύματα θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζονται με διάλυση της ελεγχόμενης ουσίας στο νερό αραίωσης. Θα πρέπει να αποφεύγεται, κατά το δυνατόν, η χρήση διαλυτών, γαλακτωματοποιητών και μέσων διασποράς. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο, οι ενώσεις αυτού του είδους ενδέχεται να χρειάζονται για την παρασκευή αρκούντως πυκνού μητρικού διαλύματος. Κατευθύνσεις όσον αφορά κατάλληλους διαλύτες, γαλακτωματοποιητές και μέσα διασποράς παρέχονται στη δημοσίευση (4). Η ελεγχόμενη ουσία στα διαλύματα ελέγχου δεν θα πρέπει σε καμία περίπτωση να υπερβαίνει το όριο διαλυτότητας στο νερό αραίωσης.

Η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται χωρίς ρύθμιση του pH. Εάν το pH δεν παραμένει εντός του πεδίου τιμών 6-9, είναι δυνατόν να διεξαχθεί δεύτερη δοκιμή με ρύθμιση του pH του μητρικού διαλύματος στην τιμή pH του νερού αραίωσης, πριν από την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας. Το pH θα πρέπει να ρυθμιστεί με τρόπο ώστε να μην μεταβληθεί σημαντικά η συγκέντρωση του μητρικού διαλύματος και να μην προκληθεί χημική αντίδραση ή καθίζηση της ελεγχόμενης ουσίας. Προτιμώνται το HCl και το NaOH.

▼B

1.8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.8.1. **Συνθήκες έκθεσης**

1.8.1.1. *Ομάδες ελέγχου και μάρτυρες*

Τα δοχεία ελέγχου πληρούνται με τους κατάλληλους όγκους νερού αραίωσης και διαλυμάτων της ελεγχόμενης ουσίας. Ο λόγος όγκων αέρα/νερού στο δοχείο θα πρέπει να είναι ο ίδιος για την ομάδα ελέγχου και την ομάδα μάρτυρα. Στη συνέχεια, φέρονται στα δοχεία ελέγχου οι δαφνιίδες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 20 ζώα, κατά προτίμηση χωρισμένα σε τέσσερις ομάδες των πέντε ζώων, για κάθε ελεγχόμενη συγκέντρωση και για τους μάρτυρες. Για κάθε ζώο θα πρέπει να προβλέπονται τουλάχιστον 2 ml διαλύματος ελέγχου (δηλ. 10 ml για πέντε δαφνιίδες ανά δοχείο ελέγχου). Η δοκιμή μπορεί να εκτελείται με ημιστατικό σύστημα με ανανέωση ή με σύστημα συνεχούς κυκλοφορίας, εάν η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας δεν είναι σταθερή.

Επιπλέον των σειρών ελέγχου, θα πρέπει να διεξάγεται δοκιμή με μία σειρά μάρτυρα που περιέχει νερό αραίωσης και μία ακόμη σειρά μάρτυρα που περιέχει το διαλυτικό μέσο, εφόσον χρησιμοποιείται.

1.8.1.2. *Συγκεντρώσεις ελέγχου*

Εάν δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας, μπορεί να διεξαχθεί διερευνητική δοκιμή για τον προσδιορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων της οριστικής δοκιμής. Για τον σκοπό αυτό, οι δαφνιίδες εκτίθενται σε σειρά συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας που απέχουν πολύ μεταξύ τους. Σε κάθε συγκέντρωση ελέγχου θα πρέπει να εκτίθενται πέντε δαφνιίδες για 48 ώρες ή μικρότερο διάστημα, χωρίς να χρειάζεται πολλαπλός προσδιορισμός. Η περίοδος έκθεσης μπορεί να συντομευτεί (π.χ. 24 ώρες ή μικρότερο διάστημα), εάν είναι δυνατόν να ληφθούν κατάλληλα δεδομένα για τους σκοπούς της διερευνητικής δοκιμής σε λιγότερο χρόνο.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις ελέγχου, διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο, κατά προτίμηση με λόγο προόδου που να μην υπερβαίνει το 2,2. Εάν έχουν χρησιμοποιηθεί λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται. Κατά προτίμηση, η υψηλότερη από τις συγκεντρώσεις ελέγχου θα πρέπει να προκαλεί ακινητοποίηση 100 %, στη δε χαμηλότερη θα πρέπει να μην παρατηρείται καμία επίδραση.

1.8.1.3. *Συνθήκες επώασης*

Η θερμοκρασία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 18 °C και 22 °C και, για κάθε επιμέρους δοκιμή, να διατηρείται σταθερή με ακρίβεια ± 1 °C. Συνιστάται φωτοπερίοδος 16/8. Το απόλυτο σκοτάδι είναι επίσης αποδεκτό, ιδίως στην περίπτωση των ασταθών στο φως ουσιών.

Τα δοχεία ελέγχου δεν πρέπει να αερίζονται στη διάρκεια της δοκιμής. Η δοκιμή εκτελείται χωρίς ρύθμιση του pH. Οι δαφνιίδες δεν θα πρέπει να τρέφονται στη διάρκεια της δοκιμής.

1.8.1.4. *Διάρκεια*

Η δοκιμή διαρκεί 48 ώρες.

1.8.2. **Παρατηρήσεις**

Κάθε δοχείο της δοκιμής θα πρέπει να ελέγχεται για τον εντοπισμό ακινητοποιημένων δαφνιίδων, 24 και 48 ώρες μετά την έναρξη της δοκιμής (βλ. ορισμούς στην ενότητα 1.2). Εκτός από την ακινητοποίηση, θα πρέπει να αναφέρεται η τυχόν αφύσικη συμπεριφορά ή εμφάνιση.

▼B

1.8.3. **Αναλυτικές μετρήσεις**

Το διαλυμένο οξυγόνο και το pH μετριούνται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής στον ή στους μάρτυρες και στην υψηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας. Η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στους μάρτυρες θα πρέπει να ανταποκρίνεται στο κριτήριο εγκυρότητας (βλ. ενότητα 1.6). Το pH δεν θα πρέπει κατά κανόνα να μεταβάλλεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδα σε καμία δοκιμή. Η θερμοκρασία μετριέται συνήθως στα δοχεία μάρτυρες ή στον αέρα του περιβάλλοντος και θα πρέπει, κατά προτίμηση, να καταγράφεται συνεχώς σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής ή, τουλάχιστον, να σημειώνεται στην αρχή και στο τέλος της.

Θα πρέπει να μετριούνται, τουλάχιστον, η υψηλότερη και η χαμηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής (4). Συνιστάται να βασίζονται τα αποτελέσματα σε συγκεντρώσεις που έχουν μετρηθεί. Εάν, ωστόσο, υπάρχουν στοιχεία που καταδεικνύουν ότι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας διατηρήθηκε ικανοποιητικά εντός των ορίων ± 20 % της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης, σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τότε τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή μετρηθείσες αρχικές τιμές.

1.9. ΟΡΙΑΚΗ ΔΟΚΙΜΗ

Εφαρμόζοντας τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή με συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας 100 mg/l ή μέχρι το όριο διαλυτότητάς της στο θρεπτικό υλικό της δοκιμής (αναλόγως του ποια είναι μικρότερη) για να διαπιστωθεί αν η EC_{50} είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση αυτή. Η οριακή δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται χρησιμοποιώντας 20 δαφνίδες (κατά προτίμηση χωρισμένες σε τέσσερις ομάδες των πέντε ζώων), με τον ίδιο αριθμό στην ή στις σειρές μάρτυρες. Εάν επέλθει ακινητοποίηση, θα πρέπει να διεξαχθεί πλήρης μελέτη. Η τυχόν παρατηρούμενη αφύσικη συμπεριφορά θα πρέπει να σημειώνεται.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο θα εμφαίνεται, για κάθε ομάδα ελέγχου και μάρτυρα, ο αριθμός δαφνιίδων που χρησιμοποιήθηκαν και η ακινητοποίηση σε κάθε παρατήρηση. Χαράσσεται καμπύλη της εκατοστιαίας αναλογίας οργανισμών που ακινητοποιήθηκαν σε 24 και σε 48 ώρες έναντι των συγκεντρώσεων ελέγχου. Τα δεδομένα υποβάλλονται σε στατιστική ανάλυση με κατάλληλες μεθόδους (π.χ. μοντέλο Probit κ.λπ.) για τον υπολογισμό της κλίσης των καμπυλών και της EC_{50} με όριο εμπιστοσύνης 95 % (p = 0,05) (7) (8).

Σε περίπτωση που οι πρότυπες μέθοδοι υπολογισμού της EC_{50}, δεν είναι δυνατόν να εφαρμοστούν στα δεδομένα που προέκυψαν, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται η υψηλότερη συγκέντρωση που δεν προκαλεί ακινητοποίηση και η χαμηλότερη συγκέντρωση που προκαλεί ακινητοποίηση 100 % για τον κατά προσέγγιση υπολογισμό της EC_50 (η οποία θεωρείται ότι ισούται με τον γεωμετρικό μέσο των δύο αυτών συγκεντρώσεων).

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική υπόσταση και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·

▼B

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης, συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας.

Ελεγχόμενο είδος οργανισμού:

— προέλευση και είδος δαφνίας, προμηθευτής του μητρικού οργανισμού (εάν είναι γνωστός) και χρησιμοποιηθείσες συνθήκες καλλιέργειας (όπου συμπεριλαμβάνονται η προέλευση, το είδος και η ποσότητα της τροφής, η συχνότητα διατροφής).

Συνθήκες δοκιμής:

— περιγραφή των δοχείων ελέγχου: τύπος δοχείων, όγκος διαλυμάτων, αριθμός δαφνιίδων ανά δοχείο, αριθμός δοχείων ελέγχου (πολλαπλός προσδιορισμός) ανά συγκέντρωση·

— μέθοδοι παρασκευής του μητρικού διαλύματος και των διαλυμάτων ελέγχου, συμπεριλαμβανομένης της τυχόν χρήσης διαλυτών ή μέσων διασποράς, χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις·

— λεπτομέρειες για το νερό αραίωσης: προέλευση και ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού (pH, σκληρότητα, λόγος Ca/Mg, λόγος Na/K, αλκαλικότητα, αγωγιμότητα, κ.λπ.), σύνθεση του νερού από ανασύσταση, εφόσον έχει χρησιμοποιηθεί·

— συνθήκες επώασης: θερμοκρασία, ένταση του φωτός και φωτοπερίοδος, διαλυμένο οξυγόνο, pH, κ.λπ..

Αποτελέσματα:

— αριθμός και εκατοστιαία αναλογία των δαφνιίδων που ακινητοποιήθηκαν ή εμφάνισαν δυσμενείς επιδράσεις (συμπεριλαμβανομένης της αφύσικης συμπεριφοράς) στις ομάδες μάρτυρες και σε κάθε ομάδα ελέγχου, σε κάθε χρονική στιγμή παρατήρησης και περιγραφή του είδους των επιδράσεων που παρατηρήθηκαν·

— αποτελέσματα και ημερομηνία διεξαγωγής της δοκιμής με ουσία αναφοράς, εάν είναι διαθέσιμα·

— ονομαστικές συγκεντρώσεις ελέγχου και το αποτέλεσμα όλων των αναλύσεων που διενεργήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στα δοχεία ελέγχου· θα πρέπει επίσης να αναφέρονται η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και το όριο προσδιορισμού·

— όλες τις φυσικοχημικές μετρήσεις της θερμοκρασίας, του pH και του διαλυμένου οξυγόνου κατά τη διάρκεια της δοκιμής·

— την τιμή EC_{50} ακινητοποίησης στις 48 ώρες, με διαστήματα εμπιστοσύνης και γραφικές παραστάσεις του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό τους, τις κλίσεις των καμπυλών δόσης-απόκρισης και το σχετικό τυπικό σφάλμα· τις στατιστικές διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της EC_50 (τα ίδια δεδομένα θα πρέπει επίσης να αναφέρονται για ακινητοποίηση στις 24 ώρες, εφόσον έχει μετρηθεί)·

— εξήγηση της ενδεχόμενης απόκλισης από τη μέθοδο δοκιμών και του κατά πόσον η απόκλιση αυτή επηρέασε τα αποτελέσματα της δοκιμής.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2. EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5. Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων. Μελέτη D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6. Κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο των χημικών ουσιών. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, που εγκρίθηκε τον Σεπτέμβριο του 1998.

7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. Pp65-84.

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Παραρτημα 1

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Ουσία	Συγκέντρωση
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	< 50 ng/l
Άθροισμα ολικών οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και πολυχλωροδιφαινυλίων	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

▼B

Παραρτημα 2

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΝΕΡΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΠΟ ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ

Νερό ελέγχου κατά ISO (1)

Μητρικά διαλύματα (μόνο μίας ουσίας)		Για την παρασκευή του νερού από ανασύσταση, προστίθενται σε 1 λίτρο νερού (*) οι ακόλουθοι όγκοι μητρικών διαλυμάτων
Ουσία	Ποσότητα προστιθέμενη σε 1 λίτρο νερού (*)	
Χλωριούχο ασβέστιο $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	11,76 g	25 ml
Θειικό μαγνήσιο $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4,93 g	25 ml
Όξινο ανθρακικό νάτριο $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Χλωριούχο κάλιο KCl	0,23 g	25 ml

(*) Νερό κατάλληλης καθαρότητας, π.χ. απιονισμένο, απεσταγμένο ή καθαρισμένο με αντίστροφη όσμωση, του οποίου η αγωγιμότητα δεν υπερβαίνει κατά προτίμηση τα 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Θρεπτικά υλικά Elendt M7 και M4

Εγκλιματισμός στα θρεπτικά υλικά Elendt M4 και M7

Ορισμένα εργαστήρια έχουν συναντήσει δυσκολίες στη μεταφορά της δαφνίας κατευθείαν στα θρεπτικά υλικά M4 και M7. Ωστόσο, αυτές υπερνικήθηκαν ως ένα βαθμό με σταδιακό εγκλιματισμό, δηλαδή μεταφορά από το οικείο θρεπτικό υλικό σε Elendt 30 %, κατόπιν σε Elendt 60 % και τέλος σε Elendt 100 %. Η διάρκεια των περιόδων εγκλιματισμού ενδέχεται να χρειαστεί να φθάσει τον ένα μήνα.

Παρασκευή

Ιχνοστοιχεία

Πρώτα παρασκευάζονται χωριστά μητρικά διαλύματα (I) των επιμέρους ιχνοστοιχείων σε νερό κατάλληλης καθαρότητας, π.χ. απιονισμένο, απεσταγμένο ή καθαρισμένο με αντίστροφη όσμωση. Από τα εν λόγω μητρικά διαλύματα (I) παρασκευάζεται ένα δεύτερο, ενιαίο μητρικό διάλυμα (II), το οποίο περιέχει όλα τα ιχνοστοιχεία (συνδυασμένο διάλυμα), δηλαδή:

Μητρικό/-ά διάλυμα/-τα I (μόνο μίας ουσίας)	Ποσότητα προστιθέμενη σε νερό (mg/l)	Συγκέντρωση (σε σχέση με το θρεπτικό υλικό M4)	Για την παρασκευή του συνδυασμένου μητρικού διαλύματος II, προστίθεται σε νερό η ακόλουθη ποσότητα μητρικού διαλύματος I (ml/l)	
			M4	M7
$H_3 BO_3$	57 190	20 000-πλάσια	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000-πλάσια	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-πλάσια	1,0	0,25

▼B

Μητρικό/-ά διάλυμα/-τα Ι (μόνο μίας ουσίας)	Ποσότητα προστιθέμενη σε νερό (mg/l)	Συγκέντρωση (σε σχέση με το θρεπτικό υλικό M4)	Για την παρασκευή του συνδυασμένου μητρικού διαλύματος ΙΙ, προστίθεται σε νερό η ακόλουθη ποσότητα μητρικού διαλύματος Ι (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000-πλάσια	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000-πλάσια	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-πλάσια	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000-πλάσια	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000-πλάσια	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-πλάσια	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000-πλάσια	1,0	1,0
KI	65	20 000-πλάσια	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000-πλάσια	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000-πλάσια	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000-πλάσια	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000-πλάσια	—	—

Τα διαλύματα Na_2EDTA και $FeSO_4$ παρασκευάζονται χωριστά, ενώνονται και αποστειρώνονται αμέσως σε αυτόκαυστο.

Με τον τρόπο αυτό λαμβάνονται:

2 l διαλύματος Fe-EDTA		1 000-πλάσια	20,0	5,0

Θρεπτικά υλικά M4 και M7

Τα θρεπτικά υλικά M4 και M7 παρασκευάζονται με χρήση του μητρικού διαλύματος ΙΙ και μητρικών διαλυμάτων μακροθρεπτικών συστατικών και βιταμινών ως εξής:

	Ποσότητα προστιθέμενη σε νερό (mg/l)	Συγκέντρωση (σε σχέση με το υλικό M4)	Προστιθέμενη ποσότητα μητρικού διαλύματος ΙΙ για την παρασκευή του υλικού (ml/l)	
			M4	M7
Μητρικό διάλυμα ΙΙ (συνδυασμός ιχνοστοιχείων)		20-πλάσια	50	50
Μητρικά διαλύματα μακροθρεπτικών συστατικών (μόνο μίας ουσίας)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000-πλάσια	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000-πλάσια	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-πλάσια	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-πλάσια	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000-πλάσια	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-πλάσια	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000-πλάσια	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-πλάσια	0,1	0,1

▼B

	Ποσότητα προστιθέμενη σε νερό (mg/l)	Συγκέντρωση (σε σχέση με το υλικό M4)	Προστιθέμενη ποσότητα μητρικού διαλύματος II για την παρασκευή του υλικού (ml/l)	
			M4	M7
Μητρικό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών	—	10 000-πλάσια	0,1	0,1

Το μητρικό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών παρασκευάζεται με την προσθήκη 3 βιταμινών σε 1 λίτρο νερού, όπως εμφαίνεται κατωτέρω:

Υδροχλωρική θειαμίνη	750	10 000-πλάσια		
Κυανοκοβαλαμίνη(B_{12})	10	10 000-πλάσια		
Βιοτίνη	7,5	10 000-πλάσια		

Το μητρικό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών φυλάσσεται στην κατάψυξη, χωρισμένο σε μικρές ποσότητες. Οι βιταμίνες προστίθενται στο θρεπτικό υλικό λίγο πριν από τη χρήση του.

ΣΗΜ.: Για να αποφευχθεί η καθίζηση αλάτων κατά την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού, οι κατάλληλες ποσότητες μητρικών διαλυμάτων προστίθενται σε 500 — 800 ml απιονισμένου νερού και κατόπιν συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο.

ΣΗΜ.: Πρώτη δημοσίευση του θρεπτικού υλικού M4: Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M1

Γ.3. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΦΥΚΗ (ΑΛΓΕΣ) ΚΑΙ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΩΝ ΥΔΑΤΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 201 (2006) του ΟΟΣΑ (1).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται και επικαιροποιούνται κατά περιόδους με τα δεδομένα της επιστημονικής προόδου. Η μέθοδος δοκιμών Γ.3 έπρεπε να αναθεωρηθεί, ώστε να συμπεριληφθούν πρόσθετα είδη οργανισμών και να καλυφθούν οι απαιτήσεις που αφορούν την εκτίμηση των κινδύνων και την ταξινόμηση των χημικών ουσιών. Η αναθεώρηση αυτή ολοκληρώθηκε με βάση την εκτενή πρακτική πείρα, την επιστημονική πρόοδο στο πεδίο των μελετών της τοξικότητας των φυκών και την ευρεία κανονιστική χρήση στο διάστημα που μεσολάβησε από την πρώτη έγκριση της μεθόδου.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί και συντμήσεις:

Βιομάζα: το ξηρό βάρος της ζώσας ύλης την οποία περιέχει ένας πληθυσμός, εκφραζόμενο ως προς δεδομένο όγκο, π.χ. mg φυκών/λίτρο διαλύματος δοκιμής. Η βιομάζα ορίζεται συνήθως ως μάζα, αλλά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών η λέξη αυτή χρησιμοποιείται για να δηλώσει τον λόγο μάζας προς όγκο. Επίσης, στην παρούσα δοκιμή μετρώνται συνήθως υποκατάστατα βιομάζας, όπως αριθμός κυττάρων, φθορισμός κ.λπ.. Ως εκ τούτου, ο όρος βιομάζα αναφέρεται και σε αυτά τα υποκατάστατα μέτρα.

Συντελεστής μεταβολής: αδιάστατο μέτρο της μεταβλητότητας μιας παραμέτρου, το οποίο ορίζεται ως ο λόγος της τυπικής απόκλισης προς τον μέσο όρο και μπορεί επίσης να εκφραστεί σε ποσοστό επί τοις εκατό. Η μέση τιμή του συντελεστή μεταβολής του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης σε πολλαπλές καλλιέργειες μάρτυρες πρέπει να υπολογίζεται ως εξής:

1. Υπολογίζεται ο επί τοις εκατό συντελεστής μεταβολής του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης από τους ημερήσιους/τμηματικούς ρυθμούς ανάπτυξης για καθεμία από τις πολλαπλές καλλιέργειες.

2. Εξάγεται ο μέσος όρος όλων των τιμών που υπολογίστηκαν στο σημείο 1, ώστε να προκύψει η μέση τιμή του συντελεστή μεταβολής του ημερήσιου/τμηματικού ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στις πολλαπλές καλλιέργειες μάρτυρες.

ECx: η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, διαλελυμένης στο υλικό δοκιμής, η οποία προκαλεί μείωση της ανάπτυξης του οργανισμού δοκιμής κατά x % (π.χ. 50 %) εντός της δηλούμενης περιόδου έκθεσης (πρέπει να αναφέρεται επακριβώς, εάν διαφέρει από την πλήρη ή κανονική διάρκεια της δοκιμής). Για να δηλώνεται σαφώς αν η τιμή EC έχει προκύψει από τον ρυθμό ανάπτυξης ή από την απόδοση, χρησιμοποιούνται τα σύμβολα «E_rC» και «E_yC», αντίστοιχα.

Θρεπτικό υλικό: το πλήρες συνθετικό μέσο καλλιέργειας, στο οποίο αναπτύσσονται τα φύκη δοκιμής, όταν εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία. Η ελεγχόμενη ουσία είναι κατά κανόνα διαλελυμένη στο υλικό δοκιμής.

Ρυθμός ανάπτυξης (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης): η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας κατά την περίοδο έκθεσης.

▼M1

Κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC, από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων Lowest Observed Effect Concentration): η χαμηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση, στην οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης (με $p < 0,05$) υπό την επίδραση της ουσίας, σε σύγκριση με τον μάρτυρα, εντός δεδομένου χρόνου έκθεσης. Ωστόσο, όλες οι ελεγχόμενες συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τη LOEC πρέπει να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση όπου δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων No Observed Effect Concentration): η αμέσως μικρότερη από τη LOEC ελεγχόμενη συγκέντρωση.

Μεταβλητή απόκρισης: μεταβλητή για την εκτίμηση της τοξικότητας, η οποία προκύπτει, με διάφορες μεθόδους υπολογισμού, από κάθε μετρούμενη παράμετρο που περιγράφει τη βιομάζα. Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου, οι ρυθμοί ανάπτυξης και η απόδοση είναι μεταβλητές απόκρισης που προκύπτουν από τη μέτρηση της βιομάζας κατευθείαν ή κάθε αναφερόμενου υποκατάστατου.

Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης: μεταβλητή απόκρισης, η οποία ορίζεται ως το πηλίκο της διαφοράς των φυσικών λογαρίθμων μιας παρατηρούμενης παραμέτρου (στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, της βιομάζας) προς το αντίστοιχο χρονικό διάστημα.

Απόδοση: ισούται με την τιμή μετρούμενης μεταβλητής στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον την τιμή της ίδιας μεταβλητής στην αρχή της περιόδου έκθεσης, διαφορά που εκφράζει την αύξηση της βιομάζας στη διάρκεια της δοκιμής.

1.3. ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται με τη μεγαλύτερη ευχέρεια σε υδατοδιαλυτές ουσίες, οι οποίες είναι πιθανόν να παραμείνουν στο νερό στις συνθήκες της δοκιμής. Για τον έλεγχο πτητικών, ισχυρώς απορροφώμενων, έγχρωμων ή δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών ή ουσιών που μπορεί να επηρεάσουν τη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων ή ανόργανων αλάτων στο υλικό δοκιμής, ενδέχεται να απαιτηθούν ορισμένες τροποποιήσεις της περιγραφόμενης διαδικασίας (π.χ. κλειστό σύστημα, εγκλιματισμός των δοκιμαστικών δοχείων). Καθοδήγηση σχετικά με ορισμένες κατάλληλες τροποποιήσεις παρέχεται στις δημοσιεύσεις (2), (3) και (4).

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η παρούσα δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό των επιδράσεων μιας ουσίας στην ανάπτυξη μικροφυκών (μικροαλγών) ή/και κυανοβακτηριδίων των γλυκών υδάτων. Οργανισμοί δοκιμής που βρίσκονται στη λογαριθμική (εκθετική) φάση ανάπτυξης εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία σε καλλιέργειες διαλείποντος έργου (ασυνεχείς) για χρονικό διάστημα 72 ωρών κατά κανόνα. Παρά τη σχετικά μικρή διάρκεια της δοκιμής, είναι δυνατόν να εκτιμηθούν οι επιδράσεις σε πολλές γενεές.

Η απόκριση του συστήματος συνίσταται στη μείωση της ανάπτυξης σε μια σειρά καλλιεργειών φυκών (μονάδες δοκιμής) που εκτίθενται σε διάφορες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Η απόκριση αξιολογείται συναρτήσει της συγκέντρωσης έκθεσης σε σύγκριση με τη μέση ανάπτυξη σε πολλαπλές καλλιέργειες μάρτυρες, οι οποίες δεν έχουν εκτεθεί στην ουσία. Για την πλήρη έκφραση της απόκρισης του συστήματος στις τοξικές επιδράσεις (βέλτιστη ευαισθησία), οι καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν λογαριθμικά χωρίς περιορισμούς, σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών στοιχείων και συνεχούς φωτισμού, για επαρκές χρονικό διάστημα, ώστε να μετρηθεί η μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης.

▼M1

Η ανάπτυξη και η αναστολή της προσδιορίζονται ποσοτικά με μετρήσεις της βιομάζας φυκών συναρτήσει του χρόνου. Η βιομάζα φυκών ορίζεται ως το ξηρό βάρος ανά μονάδα όγκου, π.χ. mg φυκών/λίτρο διαλύματος δοκιμής. Ωστόσο, το ξηρό βάρος είναι δύσκολο να μετρηθεί και, για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται υποκατάστατες παράμετροι, μεταξύ των οποίων συνηθέστερα χρησιμοποιείται ο αριθμός κυττάρων. Άλλα υποκατάστατα είναι ο κυτταρικός όγκος, ο φθορισμός, η οπτική πυκνότητα κ.λπ.. Θα πρέπει να είναι γνωστός ο συντελεστής μετατροπής της μετρούμενης υποκατάστατης παραμέτρου σε βιομάζα.

Το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, εκφραζόμενη σε λογαριθμική αύξηση της βιομάζας (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης) στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Από τους μέσους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης που καταγράφονται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης κατά x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως E_rC_x (π.χ. E_rC_{50}).

Για την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου εντός του κανονιστικού πλαισίου της ΕΕ, ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων πρέπει να βασίζεται σε μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης για τους λόγους που εκτίθενται στο σημείο 2.2 κατωτέρω. Μία επιπλέον μεταβλητή απόκρισης που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι η επίδοση, η οποία ενδέχεται να απαιτείται για τη συμμόρφωση με ειδικές κανονιστικές απαιτήσεις σε ορισμένες χώρες. Η απόδοση ορίζεται ως η βιομάζα στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον τη βιομάζα στην αρχή της περιόδου αυτής. Από την απόδοση που καταγράφεται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της απόδοσης κατά x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως E_yC_x (π.χ. EyC_{50}).

Επιπροσθέτως, μπορούν να προσδιοριστούν στατιστικά η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC).

1.5. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Στις σχετικές με την ελεγχόμενη ουσία πληροφορίες, που μπορεί να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής, περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, ο βαθμός καθαρότητας, η σταθερότητα στο φως, η σταθερότητα στις συνθήκες της δοκιμής, η απορρόφηση του φωτός, η σταθερά pKa και τα αποτελέσματα δοκιμών μετατροπής, συμπεριλαμβανομένης της βιοαποικοδομησιμότητας στο νερό.

Θα πρέπει να είναι γνωστά η διαλυτότητα στο νερό, ο συντελεστής κατανομής σε μίγμα οκτανόλης/νερού (P_{ow}) και η τάση ατμών της ελεγχόμενης ουσίας και να υπάρχει επικυρωμένη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στα διαλύματα δοκιμής, της οποίας έχουν αναφερθεί η απόδοση ανάκτησης και το όριο ανίχνευσης.

1.6. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Είναι δυνατόν να υποβληθούν σε δοκιμή μία ή περισσότερες ουσίες αναφοράς, όπως η 3,5-διχλωρο-φαινόλη που χρησιμοποιήθηκε στη διεθνή κυκλική δοκιμή (ring test) (4), προκειμένου να ελεγχθεί η διαδικασία δοκιμής. Το διχρωμικό κάλιο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως ουσία αναφοράς για τα πράσινα φύκη. Είναι σκόπιμο να υποβάλλεται η ουσία αναφοράς σε δοκιμή τουλάχιστον ανά εξάμηνο.

1.7. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια επιδόσεων:

▼M1

— Η βιομάζα στις καλλιέργειες μάρτυρες πρέπει να έχει αυξηθεί λογαριθμικά με συντελεστή τουλάχιστον 16 εντός των 72 ωρών που διαρκεί η δοκιμή. Αυτό αντιστοιχεί σε ειδικό ρυθμό ανάπτυξης 0,92 ημέρα^{-1}. Ο ρυθμός ανάπτυξης των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων ειδών είναι συνήθως σημαντικά υψηλότερος (βλέπε προσάρτημα 1). Το κριτήριο αυτό μπορεί να μην πληρούται όταν χρησιμοποιούνται είδη βραδύτερης ανάπτυξης από εκείνα που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1. Στην περίπτωση αυτή, η διάρκεια της δοκιμής πρέπει να παρατείνεται, μέχρι να επιτευχθεί τουλάχιστον δεκαεξαπλάσια αύξηση στις καλλιέργειες μάρτυρες, ενώ η ανάπτυξη πρέπει να βρίσκεται σε λογαριθμική φάση σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Η διάρκεια της δοκιμής είναι δυνατόν να συντομευτεί σε 48 ώρες, τουλάχιστον, ώστε να διατηρηθεί η απεριόριστη λογαριθμική ανάπτυξη κατά τη δοκιμή, εφόσον επιτυγχάνεται ο ελάχιστος πολλαπλασιαστής 16.

— Η μέση τιμή του συντελεστή μεταβολής για τους τμηματικούς ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης (ημέρες 0-1, 1-2 και 2-3, στην περίπτωση της δοκιμής 72 ωρών) των καλλιεργειών μαρτύρων (βλέπε σημείο 1.2 υπό «Συντελεστής μεταβολής») δεν πρέπει να υπερβαίνει το 35 %. Ο υπολογισμός του τμηματικού ειδικού ρυθμού ανάπτυξης περιγράφεται στο σημείο 2.2.1, δεύτερο εδάφιο. Το κριτήριο αυτό εφαρμόζεται στη μέση τιμή των συντελεστών μεταβολής που υπολογίζεται για τις πολλαπλές καλλιέργειες μάρτυρες.

— Στις δοκιμές σε *Pseudokirchneriella subcapitata* και *Desmodesmus subspicatus*, ο συντελεστής μεταβολής των μέσων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης των πολλαπλών καλλιεργειών μαρτύρων, στο σύνολο της περιόδου δοκιμής, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 7 %. Για άλλα, σπανιότερα χρησιμοποιούμενα είδη, η αντίστοιχη τιμή δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 %.

1.8. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.8.1. **Εργαστηριακά σκεύη και όργανα**

Τα δοκιμαστικά δοχεία και τα υπόλοιπα σκεύη που πρόκειται να έλθουν σε επαφή με τα διαλύματα δοκιμής πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα είδη του εξοπλισμού πρέπει να εκπλύνονται σχολαστικά, ώστε να εξασφαλίζεται η απουσία παρεμβολής οργανικών ή ανόργανων ξένων προσμίξεων στην ανάπτυξη των φυκών ή στη σύσταση του διαλυμάτων δοκιμής.

Τα δοκιμαστικά δοχεία είναι, κατά κανόνα, γυάλινες φιάλες, των οποίων οι διαστάσεις εξασφαλίζουν επαρκή όγκο καλλιέργειας για την εκτέλεση μετρήσεων στη διάρκεια της δοκιμής και επαρκή μεταφορά μάζας CO_2 από την ατμόσφαιρα (βλέπε σημείο 1.8.9, δεύτερο εδάφιο). Σημειωτέον ότι ο όγκος του υγρού πρέπει να επαρκεί για τους αναλυτικούς προσδιορισμούς (βλέπε σημείο 1.8.11, πέμπτο εδάφιο).

Επιπλέον, απαιτούνται ορισμένα από τα ακόλουθα όργανα ή και όλα:

— Συσκευή καλλιέργειας: συνιστάται η χρήση ερμαρίου ή θαλάμου, στο οποίο η επιλεγμένη θερμοκρασία επώασης μπορεί να διατηρείται με ακρίβεια ± 2 °C.

— Φωτόμετρα: πρέπει να σημειωθεί ότι η μέθοδος μέτρησης της φωτεινής έντασης, ειδικότερα δε ο τύπος δέκτη (συλλέκτη) επηρεάζει τη μετρούμενη τιμή. Οι μετρήσεις πρέπει να εκτελούνται κατά προτίμηση με σφαιρικό (4 π) δέκτη (που αποκρίνεται στο άμεσο και στο ανακλώμενο φως από όλες τις γωνίες πάνω και κάτω από το επίπεδο μέτρησης) ή με δέκτη 2 π (που αποκρίνεται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες πάνω από το επίπεδο μέτρησης).

▼M1

— Συσκευή προσδιορισμού της βιομάζας φυκών: Ο αριθμός κυττάρων, η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη παράμετρος ως υποκατάστατο της βιομάζας φυκών, μπορεί να καταμετρηθεί με ηλεκτρονικό απαριθμητή σωματιδίων, μικροσκόπιο με θάλαμο καταμέτρησης ή κυτταρόμετρο ροής. Άλλα υποκατάστατα της βιομάζας μπορούν να μετρηθούν με κυτταρόμετρο ροής, φθορισμόμετρο, φασματοφωτόμετρο ή χρωματόμετρο. Είναι χρήσιμο να υπολογίζεται συντελεστής μετατροπής που συνδέει τον αριθμό κυττάρων με το ξηρό βάρος. Όταν χρησιμοποιείται φασματοφωτόμετρο, ενδέχεται να απαιτούνται κυψελίδες οπτικής διαδρομής τουλάχιστον 4 cm, προκειμένου να ληφθούν χρήσιμες μετρήσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις βιομάζας.

1.8.2. **Οργανισμοί δοκιμής**

Μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορα είδη μη ενωμένων μικροφυκών και κυανοβακτηριδίων. Τα στελέχη που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1 έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για χρήση στη διαδικασία δοκιμής που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Σε περίπτωση χρήσης άλλων ειδών, θα πρέπει να αναφέρεται το στέλεχος ή/και η προέλευση. Πρέπει να επιβεβαιώνεται η δυνατότητα διατήρησης της λογαριθμικής ανάπτυξης των επιλεγμένων φυκών δοκιμής σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, στις επικρατούσες συνθήκες.

1.8.3. **Θρεπτικό υλικό**

Συνιστάται η χρήση δύο θρεπτικών υλικών εναλλακτικά: του υλικού του ΟΟΣΑ και του υλικού ΑΑΡ. Η σύσταση των υλικών αυτών παρατίθεται στο προσάρτημα 2. Σημειωτέον ότι η αρχική τιμή του pH και η ρυθμιστική χωρητικότητα (ικανότητα ρύθμισης της αύξησης του pH) των δύο θρεπτικών υλικών είναι διαφορετικές. Συνεπώς, τα αποτελέσματα των δοκιμών ενδέχεται να διαφέρουν ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο υλικό, ιδίως κατά τον έλεγχο ιονιζόμενων ουσιών.

Για ορισμένους σκοπούς, π.χ. για τον έλεγχο μετάλλων και παραγόντων χηλικής συμπλοκοποίησης ή για τη διεξαγωγή δοκιμών σε διαφορετικές τιμές pH, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να τροποποιηθούν τα θρεπτικά υλικά. Η χρήση τροποποιημένου υλικού πρέπει να περιγράφεται λεπτομερώς και να αιτιολογείται (3)(4).

1.8.4. **Αρχική συγκέντρωση βιομάζας**

Η αρχική βιομάζα στις καλλιέργειες δοκιμής πρέπει να είναι η ίδια σε όλες και αρκετά μικρή, ώστε να επιτρέπει τη λογαριθμική ανάπτυξη σε όλη τη διάρκεια της περιόδου επώασης, χωρίς τον κίνδυνο να εξαντληθούν τα θρεπτικά στοιχεία. Η αρχική βιομάζα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,5 mg/l σε ξηρό βάρος. Συνιστώνται οι ακόλουθες αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων:

Pseudokirchneriella subcapitata:	5×10^3-10^4	κύτταρα/ml
Desmodesmus subspicatus	2-5 × 10^3	κύτταρα / ml
Navicula pelliculosa	10^4	κύτταρα / ml
Anabaena flos-aquae	10^4	κύτταρα / ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4-10^5	κύτταρα / ml

1.8.5. **Συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας**

Το εύρος συγκεντρώσεων στο οποίο είναι πιθανόν να σημειωθούν επιδράσεις μπορεί να προσδιοριστεί με βάση τα αποτελέσματα δοκιμών εύρεσης εύρους τιμών. Για την τελική και οριστική δοκιμή, θα πρέπει να επιλέγονται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο, με λόγο προόδου που να μην υπερβαίνει το 3,2. Στην περίπτωση των ελεγχόμενων ουσιών με επίπεδη καμπύλη απόκρισης ως προς τη συγκέντρωση, ενδέχεται να δικαιολογείται υψηλότερος λόγος προόδου. Η σειρά των συγκεντρώσεων θα πρέπει κατά προτίμηση να καλύπτει το εύρος που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης των φυκών κατά 5-75 %.

▼M1

1.8.6. **Πολλαπλοί προσδιορισμοί (replicates) και μάρτυρες**

Ο σχεδιασμός της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τριπλό προσδιορισμό σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής. Εάν δεν απαιτείται προσδιορισμός της NOEC, είναι δυνατόν να τροποποιηθεί ο σχεδιασμός της δοκιμής, ώστε να αυξηθεί το πλήθος των συγκεντρώσεων και να μειωθεί το πλήθος των προσδιορισμών ανά συγκέντρωση. Οι μάρτυρες πρέπει να είναι τουλάχιστον τρεις και, στην ιδανική περίπτωση, τουλάχιστον διπλάσιοι από το πλήθος των προσδιορισμών σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής.

Είναι δυνατόν να παρασκευαστεί χωριστή σειρά διαλυμάτων δοκιμής για τον αναλυτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας (βλέπε σημείο 1.8.11, τέταρτο και έκτο εδάφιο).

Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης για τη διάλυση της ελεγχόμενης ουσίας, ο σχεδιασμός της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει πρόσθετους μάρτυρες, που περιέχουν τον διαλύτη στην ίδια συγκέντρωση με τη χρησιμοποιούμενη στις καλλιέργειες δοκιμής.

1.8.7. **Παρασκευή της καλλιέργειας εμβολιασμού (ενοφθαλμισμού)**

Για να προσαρμοστούν τα φύκη δοκιμής στις συνθήκες της δοκιμής και να εξασφαλιστεί ότι βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης κατά τον εμβολιασμό των διαλυμάτων δοκιμής, παρασκευάζεται καλλιέργεια εμβολιασμού 2-4 ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής. Η βιομάζα φυκών θα πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε η καλλιέργεια εμβολιασμού να είναι λογαριθμική μέχρι την έναρξη της δοκιμής. Η καλλιέργεια αυτή επωάζεται στις ίδιες συνθήκες όπως οι καλλιέργειες δοκιμής. Μετράται η αύξηση της βιομάζας στην καλλιέργεια εμβολιασμού για να εξασφαλιστεί ότι η ανάπτυξη βρίσκεται στο φυσιολογικό πεδίο τιμών για το στέλεχος δοκιμής στις συνθήκες καλλιέργειας. Παράδειγμα διαδικασίας καλλιέργειας φυκών παρέχεται στο προσάρτημα 3. Για να αποτραπεί η σύγχρονη (συγχρονισμένη) κυτταρική διαίρεση στη διάρκεια της δοκιμής, ενδέχεται να απαιτηθεί ένα δεύτερο στάδιο πολλαπλασιασμού στην καλλιέργεια εμβολιασμού.

1.8.8. **Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής**

Όλα τα διαλύματα δοκιμής πρέπει να περιέχουν τις ίδιες συγκεντρώσεις θρεπτικού υλικού και την ίδια αρχική βιομάζα φυκών δοκιμής. Τα διαλύματα δοκιμής με τις επιλεγμένες συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με ανάμιξη μητρικού διαλύματος της ελεγχόμενης ουσίας, θρεπτικού υλικού και καλλιέργειας εμβολιασμού. Τα μητρικά διαλύματα παρασκευάζονται κατά κανόνα με διάλυση της ουσίας στο υλικό δοκιμής.

Μπορούν να χρησιμοποιούνται διαλύτες, π.χ. ακετόνη, τριτ. βουτυλική αλκοόλη και διμεθυλοφορμαμίδιο, ως φορείς για την προσθήκη δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών στο υλικό δοκιμής (2)(3). Η συγκέντρωση του διαλύτη δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 μl/l, ενώ πρέπει να προστίθεται διαλύτης στην ίδια συγκέντρωση σε όλες τις καλλιέργειες της σειράς της δοκιμής (συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων).

1.8.9. **Επώαση**

Τα δοκιμαστικά δοχεία πωματίζονται με διαπερατά από τον αέρα πώματα. Τα δοχεία ανακινούνται και τοποθετούνται στη συσκευή καλλιέργειας. Κατά τη δοκιμή, είναι απαραίτητο να διατηρούνται τα φύκη σε εναιώρημα και να διευκολύνεται η μεταφορά CO_2. Για τον σκοπό αυτό, απαιτείται συνεχής ανατάραξη ή ανάδευση. Οι καλλιέργειες πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία μεταξύ 21 και 24 °C, ρυθμιζόμενη με ακρίβεια ± 2 °C. Για άλλα είδη εκτός εκείνων που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1, π.χ. τροπικά είδη, ενδέχεται να ενδείκνυνται υψηλότερες θερμοκρασίες, υπό τον όρο ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας. Συνιστάται τυχαιοποιημένη τοποθέτηση των φιαλών στον επωαστήρα και αλλαγή των θέσεών τους κάθε ημέρα.

▼M1

Το pH του υλικού μάρτυρα δεν θα πρέπει να αυξάνεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδα στη διάρκεια της δοκιμής. Στην περίπτωση των μετάλλων και των ουσιών που ιονίζονται εν μέρει σε τιμές pH γύρω από το pH της δοκιμής, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να περιοριστεί η μεταβολή του pH, προκειμένου να ληφθούν αναπαραγώγιμα και σαφή αποτελέσματα. Μεταβολή του pH < 0,5 μονάδα είναι τεχνικά εφικτή και μπορεί να επιτευχθεί με την εξασφάλιση κατάλληλης ταχύτητας μεταφοράς μάζας CO_2 από τον αέρα του περιβάλλοντος στο διάλυμα δοκιμής, π.χ. με αύξηση της ταχύτητας ανατάραξης. Άλλη δυνατότητα είναι η μείωση του απαιτούμενου CO_2 με μείωση της αρχικής βιομάζας ή της διάρκειας της δοκιμής.

Η επιφάνεια στην οποία επωάζονται οι καλλιέργειες θα πρέπει να φωτίζεται με συνεχές, ομοιόμορφο φως φθορισμού, π.χ. τύπου «ψυχρό λευκό φως» ή «φως ημέρας». Τα στελέχη φυκών και κυανοβακτηριδίων έχουν διαφορετικές απαιτήσεις φωτός. Θα πρέπει να επιλέγεται η φωτεινή ένταση που είναι κατάλληλη για τον χρησιμοποιούμενο οργανισμό δοκιμής. Για τα συνιστώμενα είδη πράσινων φυκών, η φωτεινή ένταση στο επίπεδο των διαλυμάτων δοκιμής επιλέγεται από το εύρος τιμών 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, μετρούμενη στο αποτελεσματικό από πλευράς φωτοσύνθεσης μήκος κύματος 400-700 nm με κατάλληλο δέκτη. Ορισμένα είδη, ιδίως το *Anabaena flos-aquae*, αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε χαμηλότερες τιμές φωτεινής έντασης και μπορεί να υποστούν βλάβες σε υψηλές τιμές. Για τα είδη αυτά, θα πρέπει να επιλέγεται μέση φωτεινή ένταση 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (στην περίπτωση των φωτομέτρων που είναι βαθμολογημένα σε lux, το πεδίο τιμών 4 440-8 880 lux, προκειμένου για ψυχρό λευκό φως, αντιστοιχεί περίπου στη συνιστώμενη φωτεινή ένταση των 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Η φωτεινή ένταση δεν πρέπει να μεταβάλλεται κατά περισσότερο από ± 15 % έναντι της μέσης φωτεινής έντασης στην περιοχή επώασης.

1.8.10. **Διάρκεια της δοκιμής**

Η δοκιμή διαρκεί κατά κανόνα 72 ώρες. Ωστόσο, είναι δυνατόν να επιλεγούν μικρότερα ή μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, υπό τον όρο ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που αναφέρονται στο σημείο 1.7.

1.8.11. **Μετρήσεις και αναλυτικοί προσδιορισμοί**

Προσδιορίζεται η βιομάζα φυκών σε κάθε φιάλη, τουλάχιστον κάθε ημέρα στη διάρκεια της δοκιμής. Εάν οι μετρήσεις εκτελούνται σε μικρές ποσότητες που αφαιρούνται με σιφώνιο (πιπέτα) από το διάλυμα δοκιμής, οι τελευταίες δεν θα πρέπει να αναπληρώνονται.

Η βιομάζα μετράται με χειρωνακτική καταμέτρηση κυττάρων σε μικροσκόπιο ή με ηλεκτρονικό απαριθμητή σωματιδίων (σε αριθμό κυττάρων ή/και βιο-όγκο). Μπορούν να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές τεχνικές, π.χ. κυτταρομετρία ροής, φθορισμός χλωροφύλλης in vitro ή in vivo (6)(7), οπτική πυκνότητα, εφόσον είναι δυνατόν να αποδειχθεί ικανοποιητική συσχέτιση με τη βιομάζα στο πεδίο τιμών βιομάζας που συναντάται στη δοκιμή.

Μετράται το pH των διαλυμάτων στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.

Εφόσον υπάρχει αναλυτική διαδικασία που επιτρέπει τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας στο χρησιμοποιούμενο εύρος συγκεντρώσεων, τα διαλύματα δοκιμής θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση για την εξακρίβωση των αρχικών συγκεντρώσεων και τη διατήρηση των συγκεντρώσεων έκθεσης στη διάρκεια της δοκιμής.

▼M1

Στις περιπτώσεις όπου οι συγκεντρώσεις έκθεσης αναμένεται να διαφέρουν από τις ονομαστικές συγκεντρώσεις κατά λιγότερο από 20 % στη διάρκεια της δοκιμής, ενδέχεται να αρκεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής, στο χαμηλό και στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης δοκιμής, καθώς και σε ένα επίπεδο κοντά στην αναμενόμενη EC_{50}. Συνιστάται να προσδιορίζονται όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής στην αρχή και στο τέλος της, εφόσον οι τελευταίες είναι απίθανο να παραμείνουν εντός των ορίων του 80-120 % των ονομαστικών τιμών. Προκειμένου για πτητικές, ασταθείς ή ισχυρώς απορροφώμενες ελεγχόμενες ουσίες, συνιστάται πρόσθετη δειγματοληψία για ανάλυση ανά 24 ώρες στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, ώστε να προσδιορίζεται ακριβέστερα η απώλεια ελεγχόμενης ουσίας. Στην περίπτωση των ουσιών αυτών, χρειάζεται μεγαλύτερο πλήθος προσδιορισμών. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας είναι αναγκαίο να προσδιορίζονται μόνο σε ένα από τα πολλαπλά δοχεία για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ή στο συνενωμένο περιεχόμενο των δοχείων ανά πολλαπλό προσδιορισμό).

Τα υλικά δοκιμής που παρασκευάζονται ειδικά για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων έκθεσης κατά τη δοκιμή θα πρέπει να υποβάλλονται στην ίδια ακριβώς αγωγή όπως εκείνα που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή, δηλαδή να εμβολιάζονται με φύκη και να επωάζονται σε πανομοιότυπες συνθήκες. Εάν απαιτείται προσδιορισμός της συγκέντρωσης της διαλελυμένης ελεγχόμενης ουσίας, ενδέχεται να είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των φυκών από το υλικό. Ο διαχωρισμός θα πρέπει κατά προτίμηση να εκτελείται με φυγοκέντρηση σε χαμηλή ισχύ g, επαρκή για την καθίζηση των φυκών.

Εάν υπάρχουν στοιχεία από τα οποία προκύπτει ότι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας διατηρήθηκε ικανοποιητικά εντός των ορίων της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης ± 20 % σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να βασιστεί στις ονομαστικές ή μετρηθείσες αρχικές τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση υπερβαίνει το ± 20 %, η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να βασίζεται στον γεωμετρικό μέσο όρο των συγκεντρώσεων κατά την έκθεση ή σε μοντέλα που περιγράφουν τη μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας (3)(8).

Η δοκιμή αναστολής της ανάπτυξης φυκών είναι δυναμικότερο σύστημα δοκιμών από την πλειονότητα των υπολοίπων δοκιμών βραχυπρόθεσμης τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς. Κατά συνέπεια, ενδέχεται να είναι δύσκολο να προσδιοριστούν οι πραγματικές συγκεντρώσεις έκθεσης, ιδίως όταν ελέγχονται προσροφώμενες ουσίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Στις περιπτώσεις αυτές, η εξαφάνιση της ουσίας από το διάλυμα λόγω προσρόφησης στην αυξανόμενη βιομάζα φυκών δεν σημαίνει την απώλειά της από το σύστημα δοκιμής. Κατά την ανάλυση του αποτελέσματος της δοκιμής, θα πρέπει να εξακριβώνεται κατά πόσον η μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στην πορεία της δοκιμής συνοδεύεται από ελαττωμένη αναστολή της ανάπτυξης. Εάν ναι, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο εφαρμογής κατάλληλου μοντέλου που περιγράφει τη μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας (8). Εάν όχι, μπορεί να ενδείκνυται να βασιστεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων στις αρχικές (ονομαστικές ή μετρηθείσες) συγκεντρώσεις.

1.8.12. **Άλλες παρατηρήσεις**

Στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να εκτελείται μικροσκοπική παρατήρηση για την εξακρίβωση της φυσιολογικής και υγιούς εμφάνισης της καλλιέργειας εμβολιασμού και για τον εντοπισμό τυχόν ανωμαλιών στην εμφάνιση των φυκών (τις οποίες έχει ενδεχομένως προκαλέσει η έκθεση στην ελεγχόμενη ουσία).

▼M1

1.8.13. **Οριακή δοκιμή**

Σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν από προκαταρτική δοκιμή έχει προκύψει ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε συγκεντρώσεις έως 100 $mg \cdot l^{-1}$ ή έως το όριο διαλυτότητάς της στο υλικό δοκιμής (αναλόγως του ποια είναι μικρότερη), είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή, η οποία συνίσταται σε σύγκριση των αποκρίσεων μίας ομάδας μάρτυρα και μίας ομάδας αγωγής (συγκέντρωση ίση με 100 $mg \cdot l^{-1}$ ή με το όριο διαλυτότητας). Συνιστάται ένθερμα να τεκμηριώνεται αυτό με ανάλυση της συγκέντρωσης έκθεσης. Η οριακή δοκιμή υπόκειται σε όλες τις συνθήκες δοκιμής και όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που περιγράφονται ανωτέρω, εξαιρουμένου του αριθμού των δοχείων, που θα πρέπει να είναι τουλάχιστον έξι. Οι μεταβλητές απόκρισης της ομάδας αγωγής και της ομάδας μάρτυρα είναι δυνατόν να υποβληθούν σε στατιστική ανάλυση με δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων, π.χ. δοκιμή t του Student. Εάν οι διακυμάνσεις στις δύο ομάδες είναι άνισες, θα πρέπει να διεξάγεται προσαρμοσμένη δοκιμή t για άνισες διακυμάνσεις.

1.8.14. **Τροποποίηση για ουσίες έντονου χρώματος**

Η ακτινοβόληση (φωτεινή ένταση) πρέπει να έχει τιμή ευρισκόμενη στο άνω άκρο του εύρους τιμών που καθορίζεται στην παρούσα μέθοδο: 120μE m-2 s-1 ή υψηλότερη.

Η οπτική διαδρομή πρέπει να συντομεύεται με μείωση του όγκου των διαλυμάτων δοκιμής (στο εύρος τιμών 5-25 ml).

Απαιτείται επαρκής ανατάραξη (π.χ. με ήπια ανακίνηση) ώστε να επιτυγχάνεται υψηλή συχνότητα έκθεσης των φυκών σε υψηλή φωτεινή ακτινοβολία στην επιφάνεια της καλλιέργειας.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΧΑΡΑΞΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η βιομάζα των δοκιμαστικών δοχείων μπορεί να εκφράζεται σε μονάδες της υποκατάστατης παραμέτρου που έχει χρησιμοποιηθεί για τις μετρήσεις (π.χ. αριθμός κυττάρων, φθορισμός).

Καταχωρίζονται σε πίνακα οι υπολογισθείσες συγκεντρώσεις βιομάζας στις καλλιέργειες δοκιμής και στους μάρτυρες, καθώς και οι συγκεντρώσεις υλικού δοκιμής και οι χρόνοι μέτρησης, τουλάχιστον σε ακέραιες ώρες, για τη χάραξη των καμπυλών ανάπτυξης. Στο πρώτο αυτό στάδιο είναι χρήσιμη τόσο η λογαριθμική, όσο και η γραμμική κλίμακα, αλλά η λογαριθμική κλίμακα είναι υποχρεωτική και, γενικά, παρουσιάζει ακριβέστερα τις μεταβολές του τύπου ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Σημειωτέον ότι το λογαριθμικό διάγραμμα της εκθετικής ανάπτυξης έχει τη μορφή ευθείας γραμμής, της οποίας η κλίση παρέχει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης.

Με τη βοήθεια των διαγραμμάτων, εξετάζεται αν η ανάπτυξη στις καλλιέργειες μάρτυρες είναι λογαριθμική με τον αναμενόμενο ρυθμό σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Εξετάζονται με κριτικό πνεύμα όλα τα σημεία δεδομένων, καθώς και η εμφάνιση των διαγραμμάτων και ελέγχεται η πιθανότητα σφαλμάτων στα ανεπεξέργαστα δεδομένα και στις διαδικασίες. Ειδικότερα, ελέγχονται τα σημεία δεδομένων που φαίνεται να αποκλίνουν λόγω συστηματικού σφάλματος. Εάν είναι προφανές ότι μπορούν να εντοπιστούν διαδικαστικά σφάλματα ή/και να θεωρηθούν εξαιρετικά πιθανά, τα αντίστοιχα σημεία δεδομένων σημειώνονται ως ακραίες τιμές και δεν λαμβάνονται υπόψη στη μετέπειτα στατιστική ανάλυση. (Η μηδενική συγκέντρωση φυκών σε ένα από τα δύο ή τρία δοχεία του πολλαπλού προσδιορισμού μπορεί να υποδηλώνει εσφαλμένο εμβολιασμό ή ελλιπή καθαρισμό του δοχείου). Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να αναφέρονται επακριβώς οι λόγοι απόρριψης ενός σημείου δεδομένων ως ακραίας τιμής. Αποδεκτοί λόγοι είναι μόνο τα (σπάνια) λάθη στη διαδικασία και όχι απλώς ο χαμηλός βαθμός ακρίβειας. Οι στατιστικές διαδικασίες για τον εντοπισμό των ακραίων τιμών έχουν περιορισμένη χρησιμότητα στην επίλυση προβλημάτων αυτού του είδους και δεν μπορούν να αντικαταστήσουν την κρίση του ειδικού. Οι ακραίες τιμές (σημειωμένες) θα πρέπει κατά προτίμηση να συμπεριλαμβάνονται στα σημεία δεδομένων που απεικονίζονται μεταγενέστερα σε γραφικές παραστάσεις ή πίνακες.

▼M1

2.2. ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ

Η δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό των επιδράσεων της ελεγχόμενης ουσίας στην ανάπτυξη φυκών. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφονται δύο μεταβλητές απόκρισης, δεδομένου ότι τα κράτη μέλη έχουν διαφορετικές προτιμήσεις και κανονιστικές ανάγκες. Για να είναι τα αποτελέσματα των δοκιμών αποδεκτά σε όλα τα κράτη μέλη, οι επιδράσεις θα πρέπει να αξιολογούνται με χρήση και των δύο μεταβλητών απόκρισης α) και β) που περιγράφονται κατωτέρω.

α) Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης: αυτή η μεταβλητή απόκρισης υπολογίζεται με βάση τη λογαριθμική αύξηση της βιομάζας στη διάρκεια της δοκιμής, εκφραζόμενη ανά ημέρα.

β) Απόδοση: αυτή η μεταβλητή απόκρισης ισούται με τη βιομάζα στο τέλος της δοκιμής μείον την αρχική βιομάζα.

Για την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου εντός του κανονιστικού πλαισίου της ΕΕ, ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων πρέπει να βασίζεται σε μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης για τους λόγους που εκτίθενται κατωτέρω. Σημειωτέον ότι οι τιμές τοξικότητας που υπολογίζονται με χρήση των ανωτέρω δύο μεταβλητών απόκρισης δεν είναι συγκρίσιμες και η διαφορά αυτή πρέπει να αναγνωρίζεται, όταν χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της δοκιμής. Εφόσον τηρούνται οι συνθήκες δοκιμής που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο, οι τιμές EC_x που προκύπτουν από τον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (E_rC_x) είναι γενικά υψηλότερες από τα βασιζόμενα στην απόδοση αποτελέσματα (E_yC_x), λόγω της μαθηματικής βάσης της αντίστοιχης προσέγγισης. Αυτό δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως διαφορά ευαισθησίας μεταξύ των δύο μεταβλητών απόκρισης· πρόκειται απλώς για μαθηματική διαφορά τιμών. Η έννοια του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης βασίζεται στον γενικό λογαριθμικό τύπο ανάπτυξης των φυκών σε απεριόριστες καλλιέργειες, όπου η τοξικότητα εκτιμάται με βάση τις επιδράσεις στον ρυθμό ανάπτυξης, χωρίς να εξαρτάται από την απόλυτη τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μάρτυρα ούτε από την κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης ούτε από τη διάρκεια της δοκιμής. Αντίθετα, τα αποτελέσματα που βασίζονται στην απόδοση ως μεταβλητή απόκρισης εξαρτώνται από όλες τις προαναφερόμενες άλλες μεταβλητές. Η E_yC_x εξαρτάται από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του είδους φυκών που χρησιμοποιείται σε κάθε δοκιμή, καθώς και από τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου είδους. Η συγκεκριμένη μεταβλητή απόκρισης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη σύγκριση της ευαισθησίας διαφορετικών ειδών φυκών ή στελεχών του ίδιου είδους σε τοξικούς παράγοντες. Μολονότι είναι προτιμότερο, από επιστημονική άποψη, να χρησιμοποιείται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την εκτίμηση της τοξικότητας, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει και εκτιμήσεις της τοξικότητας με βάση την απόδοση, προκειμένου να καλυφθούν οι κανονιστικές απαιτήσεις που ισχύουν σήμερα σε ορισμένες χώρες.

2.2.1. **Μέσος ρυθμός ανάπτυξης**

Ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για συγκεκριμένη χρονική περίοδο υπολογίζεται ως η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας από την ακόλουθη εξίσωση, η οποία εφαρμόζεται σε κάθε μεμονωμένο δοχείο μάρτυρα και αγωγής:

$$\mu_{i\text{-}j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad (\text{ημέρα}^{-1})$$

όπου:

$\mu_{i\text{-}j}$: μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα i έως j,

X_i: η βιομάζα σε χρόνο i,

X_j: η βιομάζα σε χρόνο j.

▼M1

Για κάθε ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή του ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης.

Υπολογίζεται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για τη συνολική διάρκεια της δοκιμής (κατά κανόνα, ημέρες 0-3), με χρήση της ονομαστικής βιομάζας που εμβολιάστηκε ως αρχικής τιμής και όχι μετρηθείσας αρχικής τιμής, επειδή με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται συνήθως μεγαλύτερη ακρίβεια. Εάν ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της βιομάζας επιτρέπει τον αρκούντως ακριβή προσδιορισμό των χαμηλών συγκεντρώσεων βιομάζας εμβολιασμού (π.χ. κυτταρόμετρο ροής), μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση βιομάζας. Υπολογίζεται επίσης ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης, ως ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για κάθε ημέρα της περιόδου δοκιμής (ημέρες 0-1, 1-2 και 2-3) και εξετάζεται αν ο ρυθμός ανάπτυξης των μαρτύρων παραμένει σταθερός (βλέπε κριτήρια εγκυρότητας στο σημείο 1.7). Ένας ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, την πρώτη ημέρα, σημαντικά χαμηλότερος από το συνολικό μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μπορεί να αποτελεί ένδειξη λανθάνουσας φάσης. Ενώ στις καλλιέργειες μάρτυρες η λανθάνουσα φάση μπορεί να ελαχιστοποιηθεί και, πρακτικά, να εξαλειφθεί με κατάλληλο πολλαπλασιασμό της προκαλλιέργειας, η ίδια φάση στις εκτιθέμενες καλλιέργειες μπορεί να υποδηλώνει ανάκαμψη μετά από την πρώτη τοξική στρες ή ελαττωμένη έκθεση λόγω απώλειας της ελεγχόμενης ουσίας (όπου συμπεριλαμβάνεται η ρόφηση στη βιομάζα φυκών) μετά την αρχική έκθεση. Ως εκ τούτου, για την αξιολόγηση των επιδράσεων της ελεγχόμενης ουσίας στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, μπορεί να υπολογιστεί ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης. Ουσιαστικές διαφορές μεταξύ του τμηματικού και του μέσου ρυθμού ανάπτυξης υποδηλώνουν απόκλιση από τη σταθερή λογαριθμική ανάπτυξη και δικαιολογούν την ενδελεχή εξέταση των καμπυλών ανάπτυξης.

Υπολογίζεται η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης για καθένα από τα πολλαπλά δοχεία αγωγής από την εξίσωση:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

όπου:

$\%I_r$: εκατοστιαία αναστολή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης,

μ_C: μέση τιμή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ) στην ομάδα μάρτυρα,

μ_T: μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στο δοχείο αγωγής.

Όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής, πρέπει να χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς της εκατοστιαίας αναστολής οι μάρτυρες με διαλύτη και όχι οι μάρτυρες χωρίς διαλύτη.

2.2.2. **Απόδοση**

Η απόδοση υπολογίζεται ως η διαφορά της βιομάζας στο τέλος της δοκιμής μείον την αρχική βιομάζα για κάθε μεμονωμένο δοχείο μάρτυρα και αγωγής. Για κάθε ελεγχόμενη συγκέντρωση και κάθε μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή της απόδοσης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης. Η εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης ($\%I_y$) μπορεί να υπολογιστεί για καθένα από τα πολλαπλά δοχεία αγωγής από τον ακόλουθο τύπο:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼M1

όπου:

$\%\ I_y$: εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης,

Y_C: μέση τιμή της απόδοσης στην ομάδα μάρτυρα,

Y_T: τιμή της απόδοσης στο δοχείο αγωγής.

2.3. ΧΑΡΑΞΗ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ-ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ

Σχεδιάζεται διάγραμμα της εκατοστιαίας αναστολής συναρτήσει του λογαρίθμου της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας. Το διάγραμμα αυτό εξετάζεται ενδελεχώς και απορρίπτονται τα σημεία δεδομένων που ενδεχομένως σημειώθηκαν ως ακραίες τιμές κατά το πρώτο στάδιο. Συνδέονται τα σημεία δεδομένων με ομαλή γραμμή, με το μάτι ή με παρεμβολή με τη βοήθεια υπολογιστή, ώστε να ληφθεί μια πρώτη εικόνα της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης και απόκρισης. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται λεπτομερέστερη μέθοδος, κατά προτίμηση στατιστική μέθοδος με υπολογιστή. Ανάλογα με τη σκοπούμενη χρήση, την ποιότητα (ακρίβεια) και τον όγκο των δεδομένων, καθώς και με τη διαθεσιμότητα εργαλείων ανάλυσης δεδομένων, είναι δυνατόν να αποφασιστεί (μερικές φορές δε, δικαιολογείται απόλυτα) να τερματιστεί η ανάλυση των δεδομένων στο στάδιο αυτό και, απλώς να ληφθούν οι βασικές τιμές EC_{50} και EC_{10} (ή/και EC_{20}) από την προσαρμοσμένη με το μάτι καμπύλη (βλέπε επίσης, κατωτέρω, το σημείο που πραγματεύεται τις διεγερτικές επιδράσεις). Βάσιμοι λόγοι για τη μη εφαρμογή στατιστικής μεθόδου μπορούν να είναι, μεταξύ άλλων, οι εξής:

— Τα δεδομένα δεν είναι κατάλληλα για να ληφθούν με μεθόδους με χρήση υπολογιστή πιο αξιόπιστα αποτελέσματα από εκείνα που αποδίδει η κρίση του ειδικού. Στις περιπτώσεις αυτές, μάλιστα, ορισμένα προγράμματα υπολογιστή ενδέχεται να μην προσφέρουν καν αξιόπιστη λύση (οι επαναλήψεις μπορεί να μην συγκλίνουν κ.λπ.).

— Οι αποκρίσεις ανάπτυξης που οφείλονται σε διέγερση δεν είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν επαρκώς με χρήση των διαθέσιμων προγραμμάτων υπολογιστή (βλέπε κατωτέρω).

2.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

Το ζητούμενο είναι να ληφθεί ποσοτική σχέση συγκέντρωσης-απόδοσης με ανάλυση παλινδρόμησης. Είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, μετά από γραμμικό μετασχηματισμό των δεδομένων απόκρισης, λόγου χάριν, σε μονάδες probit ή logit ή Weibull (9), αλλά προτιμώνται οι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης, με τις οποίες αντιμετωπίζονται καλύτερα οι αναπόφευκτες ανωμαλίες των δεδομένων και οι αποκλίσεις τους από τις ομαλές κατανομές. Στις περιοχές είτε της μηδενικής είτε της πλήρους αναστολής, οι ανωμαλίες αυτές ενδέχεται να μεγεθυνθούν από τον μετασχηματισμό και να παρεμποδίσουν την ανάλυση (9). Σημειωτέον ότι οι πρότυπες μέθοδοι ανάλυσης με χρήση αποτελεσμάτων μετασχηματισμού probit, logit ή Weibull προορίζονται για δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (π.χ. θνησιμότητα ή επιβίωση) και πρέπει να τροποποιούνται για να καλύψουν δεδομένα ανάπτυξης ή βιομάζας. Ειδικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό τιμών EC_x από συνεχή δεδομένα παρατίθενται στις δημοσιεύσεις (10) (11) και (12). Η χρήση της ανάλυσης με μη γραμμική παλινδρόμηση περιγράφεται λεπτομερέστερα στο προσάρτημα 4.

▼M1

Για κάθε μεταβλητή απόκρισης που πρόκειται να αναλυθεί, χρησιμοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης για την εκτίμηση των σημείων των τιμών EC_x. Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει να προσδιορίζονται, για κάθε εκτίμηση, τα όρια εμπιστοσύνης 95 %. Η καλή προσαρμογή των δεδομένων απόκρισης στο μοντέλο παλινδρόμησης θα πρέπει να αξιολογείται με γραφική ή στατιστική μέθοδο. Η ανάλυση παλινδρόμησης θα πρέπει να εκτελείται με χρήση των αποκρίσεων στα επιμέρους δοχεία αγωγής και όχι των μέσων όρων των ομάδων αγωγής. Εάν, ωστόσο, η μη γραμμική προσαρμογή καμπύλης είναι δύσκολη ή ανέφικτη, λόγω υπερβολικής σκεδαστικότητας των δεδομένων, το πρόβλημα μπορεί να παρακαμφθεί με την εφαρμογή της παλινδρόμησης σε μέσους όρους ομάδας ως πρακτικό μέσο περιορισμού της επιρροής των ύποπτων ακραίων τιμών. Η χρήση αυτής της εναλλακτικής επιλογής θα πρέπει να αναφέρεται στην έκθεση δοκιμής ως παρέκκλιση από την κανονική διαδικασία, οφειλόμενη στο γεγονός ότι οι προσαρμογές καμπυλών με τα δεδομένα των επιμέρους δοχείων αγωγής δεν απέδωσαν ικανοποιητικό αποτέλεσμα.

Εάν τα διαθέσιμα μοντέλα/μέθοδοι παλινδρόμησης είναι ακατάλληλα για τα δεδομένα, μπορούν επίσης να ληφθούν εκτιμήσεις και όρια εμπιστοσύνης για την EC_{50} με γραμμική παρεμβολή με τεχνικές εύρεσης εκτιμητριών bootstrap (13).

Για την εκτίμηση της LOEC και, κατ' επέκταση της NOEC, καθώς και των επιδράσεων της ελεγχόμενης ουσίας στον ρυθμό ανάπτυξης, είναι αναγκαία η σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων αγωγής με τεχνικές ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA). Στη συνέχεια, ο μέσος όρος για κάθε συγκέντρωση πρέπει να συγκρίνεται με τον μέσο όρο του μάρτυρα με κατάλληλη μέθοδο πολλαπλής σύγκρισης ή δοκιμής τάσης. Χρήσιμη για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η δοκιμή του Dunnett ή του Williams (14) (15) (16) (17) (18). Είναι απαραίτητο να εκτιμάται αν ευσταθεί η παραδοχή της ANOVA για ομοιογενή διακύμανση. Η εκτίμηση αυτή μπορεί να διενεργηθεί γραφικά ή με επίσημη δοκιμή (18). Κατάλληλες σχετικές δοκιμές είναι εκείνες του Levene και του Bartlett. Εάν δεν ισχύει η παραδοχή της ομοιογένειας της διακύμανσης, αυτό είναι μερικές φορές δυνατόν να διορθωθεί με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Στις περιπτώσεις ακραίας ετερογένειας της διακύμανσης, η οποία δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί με μετασχηματισμό, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης με μεθόδους όπως οι μειωτικές δοκιμές τάσης του Jonkheere. Πρόσθετη καθοδήγηση σχετικά με τον προσδιορισμό της NOEC παρέχεται στη δημοσίευση (12).

Οι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις υπαγόρευσαν τη σύσταση να εγκαταλειφθεί η έννοια της NOEC και να αντικατασταθεί από εκτιμήσεις των σημείων των τιμών EC_x βάσει παλινδρόμησης. Δεν έχει καθοριστεί κατάλληλη τιμή του x για την παρούσα δοκιμή σε φύκη. Φαίνεται να ενδείκνυται ένα εύρος 10 έως 20 % (ανάλογα με την επιλεγμένη μεταβλητή απόκρισης), κατά προτίμηση μάλιστα, θα πρέπει να αναφέρονται τόσο η EC_{10} όσο και η EC_{20}.

2.5. ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Μερικές φορές παρατηρείται διέγερση της ανάπτυξης (αρνητική αναστολή) σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε όρμηση (hormesis, «τοξική διέγερση») είτε στην προσθήκη διεγερτικών αυξητικών παραγόντων στο χρησιμοποιούμενο υλικό ελαχίστων θρεπτικών στοιχείων μέσω του υλικού δοκιμής. Σημειωτέον ότι η προσθήκη ανόργανων θρεπτικών στοιχείων δεν προβλέπεται να έχει άμεση επίδραση, επειδή το υλικό δοκιμής διατηρεί περίσσεια θρεπτικών στοιχείων σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Εάν η διέγερση σε χαμηλή δόση δεν είναι ακραία, συνήθως μπορεί να αγνοηθεί στους υπολογισμούς της EC_{50}. Εάν όμως είναι ακραία ή εάν πρόκειται να υπολογιστεί τιμή EC_x για χαμηλή τιμή του x, ενδέχεται να χρειαστούν ειδικές διαδικασίες. Η απαλοιφή των αποκρίσεων διέγερσης από την ανάλυση δεδομένων πρέπει, κατά το δυνατόν, να αποφεύγεται και, εάν το διαθέσιμο λογισμικό προσαρμογής καμπυλών δεν μπορεί να δεχθεί ελάσσονα διέγερση, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η γραμμική παρεμβολή με τεχνική εύρεσης εκτιμητριών bootstrap. Σε περίπτωση ακραίας διέγερσης, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης μοντέλου όρμησης (19).

▼M1

2.6. ΜΗ ΤΟΞΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Τα υλικά δοκιμής που απορροφούν το φως μπορούν να προκαλέσουν μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, επειδή η σκίαση περιορίζει τη διαθέσιμη ποσότητα φωτός. Αυτά τα είδη επιδράσεων, που οφείλονται σε φυσικά αίτια, θα πρέπει να διαχωρίζονται από τις τοξικές επιδράσεις με τροποποίηση των συνθηκών δοκιμής και να αναφέρονται χωριστά. Σχετική καθοδήγηση παρέχεται στις δημοσιεύσεις (2) και (3).

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική υπόσταση και σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του ορίου υδατοδιαλυτότητας,

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης, συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας.

Είδος οργανισμού δοκιμής:

— στέλεχος, προμηθευτής ή πηγή και χρησιμοποιηθείσες συνθήκες καλλιέργειας.

Συνθήκες δοκιμής:

— ημερομηνία έναρξης και διάρκεια της δοκιμής,

— περιγραφή του σχεδιασμού της δοκιμής: δοκιμαστικά δοχεία, όγκοι καλλιεργειών, πυκνότητα βιομάζας στην αρχή της δοκιμής,

— σύσταση του θρεπτικού υλικού,

— συγκεντρώσεις δοκιμής και πολλαπλοί προσδιορισμοί (π.χ. πλήθος προσδιορισμών, πλήθος συγκεντρώσεων δοκιμής και χρησιμοποιηθείσα γεωμετρική πρόοδος),

— περιγραφή της παρασκευής των διαλυμάτων δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης διαλυτών κ.λπ.,

— συσκευή καλλιέργειας,

— ένταση και ποιότητα του φωτός (πηγή, ομοιογένεια),

— θερμοκρασία,

— ελεγχθείσες συγκεντρώσεις: ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής και αποτελέσματα των ενδεχόμενων αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στα δοκιμαστικά δοχεία· θα πρέπει επίσης να αναφέρονται η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού στην ύλη της δοκιμής,

— όλες οι παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο δοκιμών,

— μέθοδος προσδιορισμού της βιομάζας και απόδειξη συσχέτισης της μετρούμενης παραμέτρου με το ξηρό βάρος.

Αποτελέσματα:

— τιμές pH στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής σε κάθε αγωγή,

— βιομάζα κάθε φιάλης σε κάθε σημείο μέτρησης και μέθοδος μέτρησης της βιομάζας,

▼M1

— καμπύλες ανάπτυξης (διάγραμμα της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου),

— υπολογισθείσες μεταβλητές απόκρισης για καθένα από τα πολλαπλά δοχεία αγωγής, συνοδευόμενες από τους μέσους όρους και το συντελεστή μεταβολής για τους πολλαπλούς προσδιορισμούς,

— γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-επίδρασης,

— εκτιμήσεις της τοξικότητας για τις μεταβλητές απόκρισης, π.χ. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές LOEC and NOEC, εφόσον έχουν υπολογιστεί, και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό αυτό,

— εάν έχει χρησιμοποιηθεί τεχνική ANOVA, το ανιχνεύσιμο μέγεθος της επίδρασης (π.χ. η ελάχιστη σημαντική διαφορά),

— διέγερση της ανάπτυξης που ενδεχομένως διαπιστώθηκε σε ομάδα αγωγής,

— τυχόν άλλες παρατηρηθείσες επιδράσεις, π.χ. μορφολογικές αλλαγές στα φύκη,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, όπου συμπεριλαμβάνεται η ενδεχόμενη επίδραση παρεκκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στα αποτελέσματα της δοκιμής.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

(2) ISO 1998: Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442

(3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23

(4) ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16 (Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 5667-16: Ποιότητα νερού — Δειγματοληψία — Μέρος 16: Καθοδήγηση για βιοδοκιμασίες δειγμάτων)

(5) ISO 1993: Water quality — Algal growth inhibition test. ISO 8692 (Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 8692: Ποιότητα νερού — Δοκιμή παρεμπόδισης ανάπτυξης αλγών γλυκού νερού με μονοκυτταρικές πράσινες άλγες)

(6) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525-2531

(7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp.919-925

(8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073-2079

(9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718

▼**M1**

(10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167

(11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485-1494

(12) OECD (2004): Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data

(13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN

(14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121

(15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491

(16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117

(17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531

(18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96

▼**M1**

Προσάρτημα 1

Στελέχη που έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για τη δοκιμή

Πράσινα φύκη

— *Pseudokirchneriella subcapitata* (παλαιότερα γνωστό ως Selenastrum capricornutum), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— Desmodesmus subspicatus (παλαιότερα γνωστό ως Scenedesmus subspicatus) 86.81 SAG

Διάτομα

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Κυανοβακτηρίδια

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Πηγές στελεχών

Τα συνιστώμενα στελέχη διατίθενται ως μονοκαλλιέργειες φυκών από τις ακόλουθες συλλογές (με αλφαβητική σειρά):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria
LA22 0LP
UK

SAG: Sammlung von Algenkulturen
Albrecht-von-Haller Institut
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
D-3400 Göttingen
GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

▼M1

Εμφάνιση και χαρακτηριστικά των συνιστώμενων ειδών οργανισμών

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Εμφάνιση	Καμπύλα, συστρεμμένα μεμονωμένα κύτταρα	Ωοειδή, ως επί το πλείστον μεμονωμένα κύτταρα	Ραβδία	Αλυσίδες ωοειδών κυττάρων	Ραβδία
Διαστάσεις (μήκος × πλάτος) μm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Κυτταρικός όγκος (μm^3/κύτταρο)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Κυτταρικό ξηρό βάρος (mg/κύτταρο)	2-3 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	1-2 × 10^{-8}	2-3 × 10^{-9}
Ρυθμός ανάπτυξης (3) ($ημέρα^{-1}$)	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

(1) Μετρούμενος με ηλεκτρονικό απαριθμητή σωματιδίων.
(2) Υπολογιζόμενος από τις διαστάσεις.
(3) Ο συνηθέστερα παρατηρούμενος ρυθμός ανάπτυξης στο θρεπτικό υλικό του ΟΟΣΑ, με φωτεινή ένταση 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ περίπου και σε θερμοκρασία 21 °C.

Ειδικές συστάσεις για την καλλιέργεια και τη μεταχείριση των συνιστώμενων ειδών οργανισμού δοκιμής

Pseudokirchneriella subcapitata και Desmodesmus subspicatus

Τα συγκεκριμένα πράσινα φύκη είναι γενικά εύκολο να διατηρηθούν σε διάφορα θρεπτικά υλικά. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα υλικά διατίθενται από τις συλλογές καλλιεργειών. Τα κύτταρα είναι κατά κανόνα μεμονωμένα, ενώ η κυτταρική πυκνότητα μπορεί να μετρηθεί εύκολα με ηλεκτρονικό απαριθμητή σωματιδίων ή μικροσκόπιο.

Anabaena flos-aquae

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά υλικά για τη διατήρηση μητρικών καλλιεργειών. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να μην αφήνεται η καλλιέργεια κατά παρτίδες να αναπτυχθεί πέραν της λογαριθμικής φάσης κατά την ανανέωση, επειδή η ανάκαμψη είναι δύσκολη στο σημείο αυτό.

Το *Anabaena flos-aquae* αναπτύσσεται σε συσσωματώματα από επικαλυπτόμενες αλυσίδες κυττάρων. Το μέγεθος των συσσωματωμάτων αυτών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Όταν χρησιμοποιείται μικροσκοπική καταμέτρηση ή ηλεκτρονικός απαριθμητής σωματιδίων για τον προσδιορισμό της βιομάζας, ενδέχεται να απαιτείται θραύση των εν λόγω συσσωματωμάτων.

Για τη θραύση των αλυσίδων, προκειμένου να μειωθεί η μεταβλητότητα του αριθμού κυττάρων, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η επίδραση ηχητικών κυμάτων. Η εφαρμογή ηχητικών κυμάτων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το απαιτούμενο για τη θραύση των αλυσίδων σε μικρότερα τεμάχια είναι δυνατόν να καταστρέψει τα κύτταρα. Η ένταση των ηχητικών κυμάτων και η διάρκεια της επίδρασής τους πρέπει να είναι πανομοιότυπα σε κάθε αγωγή.

Καταμετρώνται στο αιμοκυτταρόμετρο αρκετά πεδία (τουλάχιστον 400 κύτταρα) για να διευκολυνθεί η αντιστάθμιση της μεταβλητότητας. Με τον τρόπο αυτό, βελτιώνεται η αξιοπιστία των μικροσκοπικών προσδιορισμών της πυκνότητας.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ηλεκτρονικός απαριθμητής σωματιδίων για τον προσδιορισμό του συνολικού κυτταρικού όγκου των φυκών Anabaena, μετά τη θραύση των αλυσίδων κυττάρων με επιμελή εφαρμογή ηχητικών κυμάτων. Η ενέργεια των ηχητικών κυμάτων πρέπει να ρυθμίζεται για τη αποτροπή της διάρρηξης των κυττάρων.

Χρησιμοποιείται μαγνητικός αναδευτήρας (vortex) ή ανάλογη κατάλληλη μέθοδος για να εξασφαλιστούν η καλή ανάμιξη και η ομοιογένεια του εναιώρηματος φυκών με το οποίο εμβολιάζονται τα δοκιμαστικά δοχεία.

▼**M1**

Τα δοκιμαστικά δοχεία θα πρέπει να τοποθετούνται σε περιστροφικές ή παλινδρομικές τράπεζες ανακίνησης, ρυθμισμένες σε ταχύτητα περίπου 150 rpm. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η περιοδική ανακίνηση για τον περιορισμό της τάσης του Anabaena να σχηματίζει συστάδες. Εάν σχηματιστούν συστάδες, πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε τα δείγματα για τις μετρήσεις της βιομάζας να είναι αντιπροσωπευτικά. Για τη διάσπαση των συστάδων των φυκών, μπορεί να χρειαστεί ζωηρή ανακίνηση πριν από τη δειγματοληψία.

Synechococcus leopoliensis

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά υλικά για τη διατήρηση μητρικών καλλιεργειών. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα υλικά διατίθενται από τις συλλογές καλλιεργειών.

Το Synechococcus leopoliensis αναπτύσσεται σε μεμονωμένα ραβδοειδή κύτταρα. Τα κύτταρα είναι πολύ μικρά, γεγονός που περιπλέκει τη χρήση μικροσκοπικής καταμέτρησης για τον προσδιορισμό της βιομάζας. Οι ηλεκτρονικοί απαριθμητές σωματιδίων που είναι κατάλληλα εξοπλισμένοι για την καταμέτρηση σωματιδίων μεγέθους 1 μm περίπου είναι χρήσιμοι. Μπορούν επίσης να εφαρμοστούν οι μετρήσεις φθορισμού in vitro.

Navicula pelliculosa

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά υλικά για τη διατήρηση μητρικών καλλιεργειών. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα υλικά διατίθενται από τις συλλογές καλλιεργειών. Σημειωτέον ότι το θρεπτικό υλικό απαιτείται να περιέχει πυριτικό άλας.

Το Navicula pelliculosa ενδέχεται να σχηματίσει συσσωματώματα σε ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας. Λόγω της παραγωγής λιπιδίων, τα κύτταρα των φυκών τείνουν μερικές φορές να συσσωρεύονται στο επιφανειακό υμένιο. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να εφαρμόζονται ειδικά μέτρα κατά τη λήψη των μερικών δειγμάτων για τον προσδιορισμό της βιομάζας, ώστε τα δείγματα να είναι αντιπροσωπευτικά. Ενδέχεται να απαιτείται ζωηρή ανατάραξη, π.χ. με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα.

▼**M1**

Προσάρτημα 2

Θρεπτικά υλικά

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα από τα ακόλουθα δύο θρεπτικά υλικά:

το υλικό του ΟΟΣΑ: το πρωτότυπο υλικό της κατευθυντήριας γραμμής TG 201 του ΟΟΣΑ, σύμφωνο επίσης με το πρότυπο ISO 8692·

το υλικό AAP της EPA (Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Η.Π.Α.), σύμφωνο επίσης με τα πρότυπα ASTM.

Κατά την παρασκευή των ανωτέρω υλικών, πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστηρίου ή αναλυτικής καθαρότητας και απιονισμένο νερό.

Σύσταση του υλικού AAP (US. EPA) και του υλικού TG 201 του ΟΟΣΑ

Συστατικό	EPA		ΟΟΣΑ	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2.2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) Η μοριακή αναλογία EDTA προς σίδηρο υπερβαίνει ελαφρά τη μονάδα. Με τον τρόπο αυτό, αποτρέπεται η καθίζηση σιδήρου και, ταυτόχρονα, ελαχιστοποιείται ο σχηματισμός χηλικών συμπλόκων των ιόντων βαρέων μετάλλων.

Στη δοκιμή με το διάτομο Navicula pelliculosa, πρέπει να προστίθεται $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ και στα δύο μέσα, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 1,4 mg Si/l.

Το pH του θρεπτικού υλικού επιτυγχάνεται στην κατάσταση ισορροπίας μεταξύ του ανθρακικού συστήματος του υλικού και της μερικής πίεσης του CO_2 στον ατμοσφαιρικό αέρα. Το pH στους 25 °C συνδέεται, κατά προσέγγιση, με τη μοριακή συγκέντρωση όξινων ανθρακικών ιόντων με τη σχέση:

$$PH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼**M1**

Με 15 mg $NaHCO_3$/l, επιτυγχάνεται pH_{eq} = 7,5 (θρεπτικό υλικό της EPA), ενώ με 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (υλικό του ΟΟΣΑ).

Στοιχειακή σύνθεση των θρεπτικών υλικών

Στοιχείο	EPA	ΟΟΣΑ
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Παρασκευή του θρεπτικού υλικού του ΟΟΣΑ

Θρεπτικό στοιχείο	Συγκέντρωση στο μητρικό διάλυμα
Μητρικό διάλυμα 1: μακροθρεπτικά συστατικά	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Μητρικό διάλυμα 2: σίδηρος	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Μητρικό διάλυμα 3: ιχνοστοιχεία	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Μητρικό διάλυμα 4: όξινο ανθρακικό άλας	
$NaHCO_3$	50 $g \cdot l^{-1}$
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Τα μητρικά διαλύματα αποστειρώνονται με διήθηση μέσω μεμβράνης (μέση διάμετρος πόρων 0,2 μm) ή σε αυτόκαυστο (120 °C, 15 λεπτά). Τα διαλύματα φυλάσσονται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία 4 °C.

Τα μητρικά διαλύματα 2 και 4 πρέπει να μην αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο, αλλά με διήθηση μέσω μεμβράνης.

▼M1

Παρασκευάζεται θρεπτικό υλικό με την προσθήκη κατάλληλων όγκων μητρικών διαλυμάτων 1-4 σε νερό:

Σε 500 ml αποστειρωμένου νερού, προστίθενται:

— 10 ml μητρικού διαλύματος 1,

— 1 ml μητρικού διαλύματος 2,

— 1 ml μητρικού διαλύματος 3,

— 1 ml μητρικού διαλύματος 4.

Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με αποστειρωμένο νερό.

Το υλικό αφήνεται να φθάσει σε κατάσταση ισορροπίας με το ατμοσφαιρικό CO_2 για επαρκή χρόνο — εάν είναι απαραίτητο, με τη διοχέτευση φυσαλίδων στείρου φιλτραρισμένου αέρα για μερικές ώρες.

Παρασκευή του θρεπτικού υλικού της EPA

A1.1. Σε περίπου 900 ml απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού, προστίθεται 1 ml από κάθε μητρικό διάλυμα A1.2.1–A1.2.7 και το σύνολο αραιώνεται μέχρι το 1 λίτρο.

A1.2. Τα μητρικά διαλύματα μακροθρεπτικών συστατικών παρασκευάζονται με διάλυση των ακόλουθων ουσιών σε 500 ml απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Τα αντιδραστήρια A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 και A1.2.4 είναι δυνατόν να συνδυαστούν σε ένα ενιαίο μητρικό διάλυμα.

A1.2.1. $NaNO_3$-12,750 g,

A1.2.2. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 6,082 g,

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 2,205 g.

A1.2.4. Μητρικό διάλυμα μικροθρεπτικών συστατικών (βλέπε παράγραφο A1.3)

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 7, 50 g,

A1.2.6. K_2HPO_4-0,522 g,

A1.2.7. $NaHCO_3$-7,500 g,

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ — Βλέπε σημείωση A1.1.

Σημ. A.1.1 — Χρησιμοποιείται μόνο για τα είδη διατόμων. Μπορεί να προστίθεται κατευθείαν (202,4 mg) ή μέσω μητρικού διαλύματος, κατά τρόπο ώστε η τελική συγκέντρωση Si στο υλικό να είναι 20 mg/l.

A1.3. Το μητρικό διάλυμα μικροθρεπτικών συστατικών παρασκευάζεται με διάλυση των ακόλουθων ουσιών σε 500 ml απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού:

A1.3.1. H_3BO_3 — 92,760 mg,

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ — 207,690 mg,

A1.3.3. $ZnCl_2$ — 1,635 mg,

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ — 79,880 mg,

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,714 mg,

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 3,630 mg,

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,006 mg,

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ — 150,000 mg

[(αιθυλενοδινιτριλο)τετραοξικό νάτριο],

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ — 0,005 mg — Βλέπε σημείωση A1.2.

Σημ. A.1.2 — Χρησιμοποιείται μόνο στο θρεπτικό υλικό για μητρικές καλλιέργειες ειδών διατόμων.

A1.4. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 7,5 ± 0,1 με διάλυμα NaOH ή HCl 0,1 N ή 1,0 N.

A1.5. Το υλικό διηθείται σε στείρο υποδοχέα μέσω είτε διηθητικής μεμβράνης των 0,22 μm, εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί απαριθμητής σωματιδίων, είτε ηθμού των 0,45μm, εάν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί απαριθμητής σωματιδίων.

A1.6. Μέχρι να χρησιμοποιηθεί, το υλικό φυλάσσεται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία περίπου 4 °C.

▼M1

Προσάρτημα 3

Παράδειγμα διαδικασίας καλλιέργειας φυκών

Γενικές παρατηρήσεις

Σκοπός της καλλιέργειας με τη διαδικασία που ακολουθεί είναι να ληφθούν καλλιέργειες φυκών για δοκιμές τοξικότητας.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι για να εξασφαλίζεται ότι οι καλλιέργειες φυκών δεν θα μολυνθούν από βακτηρίδια. Μπορεί να είναι επιθυμητές οι αξενικές (χωρίς παρουσία ξένων οργανισμών) καλλιέργειες, αλλά πρέπει να παρασκευάζονται και να χρησιμοποιούνται μονοκαλλιέργειες φυκών.

Όλες οι εργασίες πρέπει να εκτελούνται σε στείρες συνθήκες για να αποφεύγεται η μόλυνση με βακτηρίδια και άλλα φύκη.

Εξοπλισμός και υλικά

Βλέπε μέθοδο δοκιμών, σημείο «Εργαστηριακά σκεύη και όργανα».

Διαδικασίες για λήψη καλλιεργειών φυκών

Παρασκευή διαλυμάτων θρεπτικών στοιχείων (θρεπτικά υλικά):

Όλα τα θρεπτικά άλατα του υλικού παρασκευάζονται ως πυκνά μητρικά διαλύματα και αποθηκεύονται στο σκοτάδι και υπό ψύξη. Τα διαλύματα αυτά αποστειρώνονται με διήθηση ή σε αυτόκαυστο.

Το υλικό παρασκευάζεται με την προσθήκη της ενδεδειγμένης ποσότητας μητρικού διαλύματος σε στείρο απεσταγμένο νερό, με μέριμνα για την αποφυγή μολύνσεων. Προκειμένου για στερεό θρεπτικό υλικό, προστίθεται άγαρ σε αναλογία 0,8 %.

Μητρική καλλιέργεια:

Οι μητρικές καλλιέργειες είναι μικρές καλλιέργειες φυκών που μεταφέρονται τακτικά σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό υλικό για να δράσουν ως αρχικό υλικό δοκιμής. Εάν οι καλλιέργειες δεν χρησιμοποιούνται τακτικά, απλώνονται σε σωλήνες με άγαρ υπό κλίση. Μεταφέρονται σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό υλικό τουλάχιστον ανά δίμηνο.

Οι μητρικές καλλιέργειες αναπτύσσονται σε κωνικές φιάλες που περιέχουν το κατάλληλο θρεπτικό υλικό (όγκος περίπου 100 ml). Όταν τα φύκη επωάζονται στους 20 °C με συνεχή φωτισμό, απαιτείται εβδομαδιαία μεταφορά.

Κατά τη μεταφορά, ποσότητα «παλαιάς» καλλιέργειας μεταγγίζεται με αποστειρωμένα σιφώνια σε φιάλη που περιέχει πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό υλικό, κατά τρόπο ώστε, προκειμένου για είδη ταχείας ανάπτυξης, η αρχική συγκέντρωση να είναι περίπου 100 φορές μικρότερη από εκείνη της παλαιάς καλλιέργειας.

Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός είδους μπορεί να προσδιοριστεί από την καμπύλη ανάπτυξης. Εάν αυτή είναι γνωστή, μπορεί να εκτιμηθεί η πυκνότητα στην οποία η καλλιέργεια θα πρέπει να μεταφερθεί σε νέο θρεπτικό υλικό. Ο σχετικός υπολογισμός πρέπει να γίνεται πριν η καλλιέργεια φθάσει στη φάση θανάτου.

Προκαλλιέργεια:

Η προκαλλιέργεια προορίζεται να προσφέρει την κατάλληλη ποσότητα φυκών για τον εμβολιασμό των καλλιεργειών δοκιμής. Η προκαλλιέργεια επωάζεται στις συνθήκες δοκιμής και χρησιμοποιείται ενώ βρίσκεται ακόμη στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, κατά κανόνα μετά από περίοδο επώασης 2-4 ημερών. Όταν οι καλλιέργειες φυκών περιέχουν παραμορφωμένα ή ανώμαλα κύτταρα, πρέπει να απορρίπτονται.

▼M1

Προσάρτημα 4

Ανάλυση δεδομένων με μη γραμμική παλινδρόμηση

Γενικά

Η απόκριση στις δοκιμές σε φύκη και στις λοιπές δοκιμές μικροβιακής ανάπτυξης — η αύξηση της βιομάζας— είναι εκ φύσεως συνεχής ή μετρική μεταβλητή: συνίσταται σε ταχύτητα διεργασίας, εάν χρησιμοποιείται ο ρυθμός ανάπτυξης και στο ολοκλήρωμά της ως προς τον χρόνο, εάν έχει επιλεγεί η βιομάζα. Και τα δύο συσχετίζονται με τον αντίστοιχο μέσο όρο της απόκρισης πολλαπλών καλλιεργειών μαρτύρων, οι οποίες δεν εκτίθενται και παρουσιάζουν μέγιστη απόκριση στις επιβαλλόμενες συνθήκες — κατά τη δοκιμή σε φύκη, το φως και η θερμοκρασία αποτελούν τους πρωταρχικούς καθοριστικούς παράγοντες. Το σύστημα είναι κατανεμημένο ή ομοιογενές, ενώ η βιομάζα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα συνεχές, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τα επιμέρους κύτταρα. Για το σύστημα αυτό, η κατανομή της διακύμανσης του τύπου απόκρισης συνδέεται μόνο με τους πειραματικούς παράγοντες (περιγράφεται τυπικά από τη λογαριθμοκανονική ή την κανονική κατανομή του σφάλματος). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις τυπικές αποκρίσεις των βιοδοκιμασιών με δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (quantal), όπου η ανοχή (με τυπική διωνυμική κατανομή) των επιμέρους οργανισμών υποτίθεται συχνά ότι είναι η κυρίαρχη συνιστώσα της διακύμανσης. Οι αποκρίσεις του μάρτυρα, εν προκειμένω, είναι μηδέν ή επίπεδο υποβάθρου.

Στη μη πεπλεγμένη κατάσταση, η κανονικοποιημένη ή σχετική απόκριση, r, μειώνεται με μονοτονία από το 1 (μηδενική αναστολή) έως το 0 (100 % αναστολή). Σημειωτέον ότι όλες οι αποκρίσεις έχουν σφάλμα και ότι φαινόμενη αρνητική αναστολή είναι δυνατόν να υπολογιστεί μόνο ως επακόλουθο τυχαίου σφάλματος.

Ανάλυση παλινδρόμησης

Μοντέλα

Η ανάλυση παλινδρόμησης αποσκοπεί στην ποσοτική περιγραφή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης με μαθηματική συνάρτηση παλινδρόμησης, που έχει τη μορφή Y = f (C) ή, συνηθέστερα, F (Z), όπου Z = log C. Η εφαρμογή της αντίστροφης συνάρτησης, $C = f^{-1} (Y)$, επιτρέπει τον υπολογισμό τιμών EC_x, μεταξύ των οποίων οι EC_{50}, EC_{10} και EC_{20}, καθώς και των οικείων ορίων εμπιστοσύνης 95 %. Έχει αποδειχθεί ότι οι σχέσεις συγκέντρωσης-απόκρισης που προκύπτουν από τις δοκιμές αναστολής της ανάπτυξης φυκών περιγράφονται επιτυχώς από διάφορες απλές μαθηματικές συναρτήσεις. Στις τελευταίες περιλαμβάνονται, λόγου χάριν, η λογιστική εξίσωση, η ασύμμετρη εξίσωση του Weibull και η συνάρτηση της λογαριθμοκανονικής κατανομής — όλες σιγμοειδείς καμπύλες που τείνουν ασυμπτωτικά προς το 1, όταν C → 0, και προς το μηδέν, όταν C → άπειρο.

Τελευταία, προτείνεται η χρήση μοντέλων συνεχούς συνάρτησης ορίου (π.χ. μοντέλο Kooijman για την αναστολή της ανάπτυξης πληθυσμού — «for inhibition of population growth» Kooijman et al. 1996) αντί των ασυμπτωτικών μοντέλων. Τα μοντέλα αυτά βασίζονται στην υπόθεση ότι δεν υπάρχουν επιδράσεις σε συγκεντρώσεις κάτω από ένα όριο, EC0+, το οποίο υπολογίζεται με παρεκβολή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης μέχρι να τέμνει τον άξονα των συγκεντρώσεων, με την εφαρμογή απλής συνεχούς συνάρτησης που δεν είναι διαφορίσιμη στο αρχικό σημείο.

Σημειωτέον ότι η ανάλυση μπορεί να συνίσταται σε απλή ελαχιστοποίηση των αθροισμάτων των τετραγώνων των καταλοίπων (με την παραδοχή σταθερής διακύμανσης) ή των σταθμισμένων τετραγώνων, εάν αντισταθμίζεται η ετερογένεια της διακύμανσης.

▼M1

Διαδικασία

Η διαδικασία μπορεί να συνοψιστεί ως εξής: επιλέγεται η κατάλληλη συναρτησιακή εξίσωση, Y = f (C), και προσαρμόζεται στα δεδομένα με μη γραμμική παλινδρόμηση. Χρησιμοποιούνται, κατά προτίμηση, οι μετρηθείσες τιμές για κάθε επιμέρους φιάλη αντί των μέσων τιμών των πολλαπλών φιαλών, ώστε να ληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες από τα δεδομένα. Αντίθετα, σε περίπτωση μεγάλης διακύμανσης, η πρακτική εμπειρία έχει δείξει ότι οι μέσες τιμές των πολλαπλών φιαλών είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε ακριβέστερη μαθηματική εκτίμηση, επηρεαζόμενη σε μικρότερο βαθμό από τα τυχαία σφάλματα των δεδομένων, απ' ό,τι η εκτίμηση με κάθε επιμέρους σημείο δεδομένων που έγινε δεκτό.

Σχεδιάζεται το διάγραμμα της προσαρμοσμένης καμπύλης και των δεδομένων των μετρήσεων και εξετάζεται κατά πόσον η προσαρμογή της καμπύλης είναι η ενδεδειγμένη. Ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η ανάλυση των καταλοίπων. Εάν η συναρτησιακή σχέση που επιλέχθηκε για την προσαρμογή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης δεν περιγράφει ικανοποιητικά το σύνολο της εν λόγω καμπύλης ή κάποιο ουσιώδες τμήμα της, λόγου χάριν την απόκριση σε χαμηλές συγκεντρώσεις, επιλέγεται άλλη δυνατότητα προσαρμογής — π.χ. ασύμμετρη καμπύλη, όπως η συνάρτηση Weibull, αντί της συμμετρικής. Η αρνητική αναστολή ενδέχεται να αποτελέσει πρόβλημα, για παράδειγμα με τη συνάρτηση της λογαριθμοκανονικής κατανομής, το οποίο απαιτεί ομοίως εναλλακτική συνάρτηση παλινδρόμησης. Δεν συνιστάται να δίδεται στις αρνητικές αυτές τιμές η τιμή μηδέν ή μικρή θετική τιμή, διότι αυτό στρεβλώνει την κατανομή του σφάλματος. Για τον υπολογισμό των τιμών $EC_{χαμηλό\ x}$ μπορεί να ενδείκνυνται χωριστές προσαρμογές σε τμήματα της καμπύλης, όπως εκείνο που αντιστοιχεί στο χαμηλό επίπεδο αναστολής. Από την προσαρμοσμένη εξίσωση υπολογίζονται [με «αντίστροφη επίλυση», $C = f^{-1} (Y)$] χαρακτηριστικές τιμές σημείου EC_x και αναφέρονται, τουλάχιστον, η EC_{50} και μία ή δύο $EC_{χαμηλό\ x}$. Η πρακτική εμπειρία από τη διενέργεια δοκιμών έχει δείξει ότι, κατά κανόνα, η ακρίβεια της μεθόδου δοκιμών σε φύκη επιτρέπει εύλογα ακριβείς εκτιμήσεις στο επίπεδο αναστολής 10 %, εφόσον επαρκούν τα σημεία δεδομένων — εκτός εάν εμφανιστεί διέγερση στις χαμηλές συγκεντρώσεις ως παράγοντας σύγχυσης. Συχνά, η ακρίβεια της εκτίμησης της EC_{20} είναι σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη της EC_{10}, επειδή η EC_{20} βρίσκεται συνήθως στο σχεδόν ευθύγραμμο τμήμα της κεντρικής καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ερμηνεία της EC_{10} είναι δυνατόν να παρουσιάζει δυσκολίες, οφειλόμενες σε διέγερση της ανάπτυξης. Για τον λόγο αυτό, μολονότι η EC_{10} προκύπτει κατά κανόνα με επαρκή ακρίβεια, συνιστάται να αναφέρεται πάντα και η EC_{20}.

Συντελεστές στάθμισης

Επειδή η πειραματική διακύμανση δεν είναι γενικά σταθερή και, συνήθως, περιλαμβάνει μια αναλογική συνιστώσα, αποτελεί πλεονέκτημα η εφαρμογή σταθμισμένης παλινδρόμησης ως πάγια πρακτική. Για την ανάλυση αυτή, υποτίθεται, κατά κανόνα, ότι οι συντελεστές στάθμισης είναι αντιστρόφως ανάλογοι της διακύμανσης:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Πολλά προγράμματα παλινδρόμησης παρέχουν τη δυνατότητα ανάλυσης σταθμισμένης παλινδρόμησης, περιλαμβάνοντας πίνακα με συντελεστές στάθμισης. Εξυπηρετεί να κανονικοποιούνται οι συντελεστές στάθμισης, πολλαπλασιαζόμενοι επί $n/\Sigma\ w_i$ (όπου n ο αριθμός των σημείων δεδομένων), ώστε το άθροισμά τους να ισούται με τη μονάδα.

Κανονικοποίηση των αποκρίσεων

Η κανονικοποίηση με βάση τη μέση τιμή απόκρισης των μαρτύρων δημιουργεί ορισμένα προβλήματα αρχής και οδηγεί σε σχετικά περίπλοκη δομή της διακύμανσης. Η διαίρεση των αποκρίσεων δια του μέσου όρου των αποκρίσεων των μαρτύρων για να ληφθεί η εκατοστιαία αναστολή, εισάγει ένα πρόσθετο σφάλμα, οφειλόμενο στο σφάλμα του μέσου όρου των μαρτύρων. Εάν το σφάλμα αυτό δεν είναι αμελητέο, οι συντελεστές στάθμισης και τα όρια εμπιστοσύνης της παλινδρόμησης πρέπει να διορθωθούν, ώστε να ληφθεί υπόψη συνδιακύμανση με τον μάρτυρα (17). Σημειωτέον ότι η μεγάλη ακρίβεια στην εκτίμηση της μέσης τιμής της απόκρισης των μαρτύρων έχει σημασία για την ελαχιστοποίηση της συνολικής διακύμανσης της σχετικής απόκρισης. Η διακύμανση αυτή παρέχεται από τις ακόλουθες σχέσεις:

▼M1

(Ο δείκτης i αναφέρεται στο επίπεδο συγκέντρωσης i και ο δείκτης 0 στους μάρτυρες.)

$$Y_i = \text{Σχετική απόκριση} = r_i/r_0 = 1 — I = f(C_i)$$

με διακύμανση:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

Δεδομένου ότι ισχύει

$$(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0 \text{ και } (\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$$

με κανονική κατανομή των δεδομένων και με πλήθος προσδιορισμών m_i και m_0:

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

η εξίσωση που παρέχει τη συνολική διακύμανση της σχετικής απόκρισης Y_i λαμβάνει τη μορφή:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\ m_0$$

Το σφάλμα του μέσου όρου των μαρτύρων είναι αντιστρόφως ανάλογο προς την τετραγωνική ρίζα του πλήθους των δοχείων μαρτύρων από το οποίο εξήχθη ο μέσος όρος. Ως εκ τούτου, μερικές φορές δικαιολογείται η προσθήκη ιστορικών δεδομένων, με την οποία περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό το σφάλμα. Μια εναλλακτική διαδικασία συνίσταται στη μη κανονικοποίηση των δεδομένων και στην προσαρμογή των απόλυτων τιμών απόκρισης, συμπεριλαμβανομένης της τιμής της απόκρισης του μάρτυρα, η οποία όμως εισάγεται ως πρόσθετη παράμετρος για προσαρμογή με μη γραμμική παλινδρόμηση. Με τη συνήθη διπαραμετρική εξίσωση παλινδρόμησης, η μέθοδος αυτή απαιτεί την προσαρμογή τριών παραμέτρων και, συνεπώς, περισσότερα σημεία δεδομένων από τη μη γραμμική παλινδρόμηση σε δεδομένα που έχουν κανονικοποιηθεί με χρήση προκαθορισμένης απόκρισης μάρτυρα.

Αντίστροφα διαστήματα εμπιστοσύνης

Ο υπολογισμός διαστημάτων εμπιστοσύνης στη μη γραμμική παλινδρόμηση με αντίστροφη επίλυση είναι σχετικά πολύπλοκος και δεν διατίθεται ως βασική επιλογή στα συνήθη στατιστικά προγράμματα υπολογιστών. Κατά προσέγγιση όρια εμπιστοσύνης είναι δυνατόν να ληφθούν από τα τυποποιημένα προγράμματα μη γραμμικής παλινδρόμησης με αναπαραμετροποίηση (Bruce and Versteeg, 1992), η οποία περιλαμβάνει νέα γραφή της μαθηματικής εξίσωσης, με τις επιθυμητές εκτιμήσεις σημείων, π.χ. EC_{10} και EC_{50}, ως παραμέτρους προς υπολογισμό. (Έστω η εξίσωση I = f (α, β, συγκέντρωση), στην οποία το f (α, β, συγκέντρωση) αντικαθίσταται από την ισοδύναμη συνάρτηση g (EC_{10}, EC_{50}, συγκέντρωση) με χρήση των σχέσεων ορισμού f (α, β, EC_{10}) = 0,1 και f (α, β, EC_{50}) = 0,5.

Πιο άμεσος υπολογισμός (Andersen et al, 1998) εκτελείται με τη διατήρηση της αρχικής εξίσωσης και τη χρήση αναπτύγματος Taylor γύρω από τις μέσες τιμές των r_i και r_0.

Πρόσφατα, διαδόθηκαν ευρέως οι μέθοδοι εύρεσης εκτιμητριών bootstrap. Στις μεθόδους αυτές, χρησιμοποιούνται τα δεδομένα από τις μετρήσεις και η συχνή νέα δειγματοληψία, η οποία κατευθύνεται από γεννήτρια τυχαίων αριθμών, για την εκτίμηση εμπειρικής κατανομής της διακύμανσης.

Βιβλιογραφία

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, 30, 1625-1632.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem.11, 1485-1494

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405-420.

▼B

Γ.4. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΤΗΣ «ΑΜΕΣΗΣ» ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

ΜΕΡΟΣ 1. ΓΕΝΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ

Ι.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Περιγράφονται έξι μέθοδοι δοκιμής χημικών ουσιών ως προς την άμεση βιοαποικοδομησιμότητά τους σε αερόβιο υδατικό μέσο:

(α) Ελάττωση Διαλελυμένου Οργανικού Άνθρακα (DOC) (Μέθοδος Γ.4-Α)

(β) Τροποποιημένη Μέθοδος ΟΟΣΑ — Ελάττωση DOC (Μέθοδος Γ.4-Β)

(γ) Έκλυση διοξειδίου του άνθρακα (C02) (Τροποποιημένη δοκιμή STURM) (Μέθοδος Γ.4-Γ)

(δ) Μανομετρική αναπνευσιομετρία (Μέθοδος Γ.4-Δ)

(ε) Κλειστή φιάλη (Μέθοδος Γ.4-Ε)

(στ) MITI (Ministry of International Trade and Industry — Ιαπωνία) (Μέθοδος Γ.4-Ζ)

Στο Μέρος Ι της μεθόδου περιλαμβάνονται γενικά θέματα όπως επίσης και θέματα κοινά και για τις έξι δοκιμές. Τα Μέρη ΙΙ έως VII αναφέρονται ειδικά σε συγκεκριμένες μεθόδους. Τα Παραρτήματα περιέχουν ορισμούς, τύπους και οδηγίες.

Από διεργαστηριακή συγκριτική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε από τον ΟΟΣΑ το 1988, διαπιστώθηκε ότι οι μέθοδοι παρέχουν συναφή αποτελέσματα. Παρ' όλα αυτά, ανάλογα με τα φυσικά χαρακτηριστικά της εξεταζόμενης ουσίας, μπορεί να προτιμηθεί η μια ή η άλλη μέθοδος.

Ι.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προκειμένου να επιλεγεί η καταλληλότερη μέθοδος, ουσιαστικό ρόλο παίζει η ύπαρξη στοιχείων για τη διαλυτότητα, την τάση ατμών Kat τα χαρακτηριστικά προσρόφησης της ουσίας. Για τον υπολογισμό των θεωρητικών τιμών και/ή τον έλεγχο των μετρουμένων τιμών παραμέτρων, π.χ. ThOD, ThC02, DOC, TOC, COD (βλ. Παραρτήματα Ι και ΙΙ), θα πρέπει να είναι γνωστή η χημική δομή ή ο μοριακός τύπος της ουσίας.

Χημικές ουσίες που η διαλυτότητά τους στο νερό είναι τουλάχιστον 100 mg/I μπορούν να αξιολογηθούν με όλες τις μεθόδους, με την προϋπόθεση ότι δεν είναι πτητικές και προσροφητικές. Για τις χημικές ουσίες που είναι ασθενώς διαλυτές στο νερό, πτητικές ή προσροφητικές, κατάλληλες μέθοδοι είναι εκείνες που παρατίθενται στον Πίνακα 1. Ο τρόπος μεταχείρισης των ασθενώς υδατοδιαλυτών χημικών ουσιών και των πτητικών χημικών ουσιών περιγράφεται στο Παράρτημα ΙΙΙ. Οι μετρίως πτητικές χημικές ουσίες μπορούν να υποβάλλονται σε δοκιμή με τη μέθοδο της Ελάττωσης του DOC εφόσον υπάρχει επαρκής χώρος αερίου στα δοχεία δοκιμής (τα οποία πρέπει να είναι κατάλληλα πωματισμένα). Σ' αυτή την περίπτωση πρέπει να γίνεται αβιοτικός έλεγχος προκειμένου να λαμβάνεται υπόψη οποιαδήποτε φυσική απώλεια.

▼B

Πίνακας 1

Δυνατότητα εφαρμογής των μεθόδων δοκιμής

Δοκιμή	Αναλυτική μέθοδος	Καταλληλότητα για ενώσεις οι οποίες είναι		
		ασθενώς διαλυτές	πτητικές	προσροφητικές
Ελάττωση DOC	Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας	—	—	+/-
Τροποποιημένη μέθοδος ΟΟΣΑ	Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας	—	—	+/-
Έκλυση CO_2,	Αναπνευσιομετρία: έκλυση CO_2,	+	—	+
Μανομετρική αναπνευσιομετρία	Μανομετρική αναπνευσομετρία: κατανάλωση O_2	+	+/-	+
Κλειστή φιάλη	Αναπνευσιομετρία: διαλελυμένο οξυγόνο	+/-	+	+
ΜΙΤΙ	Αναπνευσιομετρία: κατανάλωση οξυγόνου	+	+	+

Για την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων, ειδικά όταν αυτά είναι μικρά ή οριακά, απαιτούνται στοιχεία για την καθαρότητα ή τις σχετικές αναλογίες των βασικών συστατικών του υλικού δοκιμής.

Τυχόν πληροφορίες για την τοξικότητα του εξεταζόμενου χημικού προϊόντος απέναντι στα βακτήρια (Παράρτημα IV) μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων για τη δοκιμή ενώ μπορεί να παίζουν βασικό ρόλο στην ερμηνεία χαμηλών τιμών βιοαποικοδόμησης.

I.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για τον έλεγχο της διαδικασίας, ουσίες αναφοράς που πληρούν τα κριτήρια για την άμεση βιοαποικοδομησιμό-τητα υποβάλλονται σε δοκιμή παρασκευάζοντας το κατάλληλο διάλυμα σε φιάλη που εξετάζεται παράλληλα με την κανονική διαδικασία δοκιμής.

Κατάλληλες χημικές ουσίες είναι η ανιλίνη (πρόσφατα απεσταγμένη), το οξικό νάτριο και το βενζοϊκό νάτριο. Όλες αυτές οι ουσίες αποικοδομούνται με τις μεθόδους αυτές ακόμη κι όταν δεν προστεθεί εμβόλιο για το σκοπό αυτό.

Πρόταθηκε να αναζητηθεί μια ουσία αναφοράς που να είναι ευκόλως βιοαποικοδομήσιμη αλλά που να χρειάζεται την προσθήκη εμβολίου. Έχει προταθεί το όξινο φθαλικό κάλιο, χρειάζονται όμως ακόμη ορισμένα αποδεικτικά στοιχεία με αυτή την ουσία πριν γίνει αποδεκτή σαν ουσία αναφοράς.

Στις αναπνευσιομετρικές δοκιμές, οι ενώσεις που περιέχουν άζωτο μπορεί να επηρεάσουν την ανάλωση οξυγόνου εξαιτίας νιτροποίησης (βλ. Παραρτήματα II και V).

I.4. ΑΡΧΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΟΚΙΜΗΣ

Διάλυμα ή εναιώρημα της εξεταζόμενης ουσίας σε ανόργανο μέσον εμβολιάζεται και επωάζεται κάτω από αερόβιες συνθήκες στο σκότος ή σε διάχυτο φως. Η ποσότητα DOC στο διάλυμα αραίωσης λόγω του εμβολίου θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλότερη σε σύγκριση με την ποσότητα DOC που οφείλεται στην εξεταζόμενη ουσία. Η ενδογενής δραστικότητα του εμβολίου λαμβάνεται υπόψη εκτελώντας παράλληλα τυφλά πειράματα με εμβόλιο αλλά χωρίς εξεταζόμενη ουσία στο διάλυμα, παρ' όλο ότι η ενδογενής δραστικότητα των κυττάρων με την παρουσία της ουσίας δεν προσομοιάζει ακριβώς με εκείνη του ενδογενή μάρτυρα. Γίνεται παράλληλη δοκιμή μιας ουσίας αναφοράς για τον έλεγχο της εκτέλεσης των διαδικασιών.

▼B

Γενικά, η αποικοδόμηση παρακολουθείται με τον προσδιορισμό παραμέτρων, όπως DOC, παραγωγή CO_2 και εκτελούνται μετρήσεις σε ικανοποιητικά συχνά διαστήματα που επιτρέπουν την αναγνώριση της έναρξης και της περάτωσης της βιοαποικοδόμησης. Με αυτόματα αναπνευσιόμετρα η μέτρηση είναι συνεχής. Ο DOC μετριέται μερικές φορές μαζί με κάποια άλλη παράμετρο αλλά αυτό γίνεται συνήθως μόνο στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Μπορεί επίσης να γίνει και ειδική χημική ανάλυση για να εκτιμηθεί η πρωταρχική αποικοδόμηση της εξεταζόμενης ουσίας και να προσδιορισθεί η συγκέντρωση οποιασδήποτε σχηματιζόμενης ενδιάμεσης ουσίας (πράγμα υποχρεωτικό στην περίπτωση της δοκιμής MITI).

Κανονικά, η δοκιμή διαρκεί 28 ημέρες. Παρ' όλα αυτά, οι δοκιμές μπορεί να τερματισθούν και πρίν από τις 28 ημέρες, π.χ. αμέσως όταν η καμπύλη βιοαποικοδόμησης έχει φθάσει σε οριακό επίπεδο για τρεις τουλάχιστον προσδιορισμούς. Οι δοκιμές μπορούν επίσης να παραταθούν και πέραν των 28 ημερών όταν από την καμπύλη φαίνεται ότι άρχισε η βιοαποικοδόμηση αλλά δεν έχει ακόμη φθάσει, την 28η ημέρα, σε οριακό επίπεδο.

I.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

I.5.1. **Αναπαραγωγιμότητα**

Λόγω της φύσης της βιοαποικοδόμησης και των μεικτών βακτηριακών πληθυσμών που χρησιμοποιούνται σαν εμβόλια, οι προσδιορισμοί θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον δύο φορές.

Αποτελεί κοινή εμπειρία το ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των μικροοργανισμών που προστίθενται αρχικά στο μέσον δοκιμής τόσο μικρότερη θα είναι η διακύμανση μεταξύ των επαναληπτικών δοκιμασιών. Από διεργαστηριακές δοκιμές διαπιστώθηκε επίαης ότι μπορεί να υπάρξουν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από διάφορα εργαστήρια, κανονικά όμως επιτυγχάνεται καλή συμφωνία με εύκολα-βιοαποικοδομήσιμες ουσίες.

I.5.2. **Εγκυρότητα της δοκιμής**

Μία δοκιμή θεωρείται έγκυρη αν η διαφορά των ακρότατων επαναληπτικών τιμών απομάκρυνσης της εξεταζόμενης ουσίας στο οριακό επίπεδο, στο τέλος της δοκιμής ή στο τέλος του παραθύρου των 10 ημερών όπως ενδείκνυται, είναι μικρότερη του 20 % και αν η εκατοστιαία αποικοδόμηση της ουσίας αναφοράς έχει φθάσει το επίπεδο της άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας στις 14 ημέρες. Εάν οποιαδήποτε από τις συνθήκες αυτές δεν εκπληρώνεται, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται. Εξαιτίας της αυστηρότητας των μεθόδων, χαμηλές τιμές δεν σημαίνουν κατ' ανάγκη ότι η εξεταζόμενη ουσία δεν είναι βιοαποικοδομήσιμη κάτω από τις συνθήκες περιβάλλοντος, δείχνουν όμως ότι απαιτείται περισσότερη εργασία για την επίτευξη βιοαποικοδομησιμότητας.

Εάν σε μία δοκιμή τοξικότητας, στην οποία συμπεριλαμβάνεται τόσο η εξεταζόμενη ουσία όσο και κάποια ουσία αναφοράς, επέρχεται σε 7-14 ημέρες μικρότερη από 35 % αποικοδόμηση (με βάση το DOC) ή μικρότερη από 25 % (με βάση το ThOD ή $ThC0_2$), οι εξεταζόμενες χημικές ουσίες μπορούν να θεωρούνται σαν ανασταλτικές (βλ. επίσης Παράρτημα IV). Η σειρά των δοκιμών θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, αν είναι δυνατόν χρησιμοποιώντας μικρότερη συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας και/ή μεγαλύτερη συγκέντρωση εμβολίου, όχι όμως μεγαλύτερη από 30 mg στερεών/λίτρο.

I.6. ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΕΣ

Οι γενικοί όροι που ισχύουν για τις δοκιμές συνοψίζονται στον Πίνακα 2. Ο εξοπλισμός και οι άλλες πειραματικές συνθήκες που αφορούν ειδικά μία συγκεκριμένη δοκιμή, περιγράφονται αργότερα στο κείμενο που αναφέρεται στη δοκιμή αυτή.

▼B

Πίνακας 2

Συνθήκες δοκιμών

Δοκιμή	Ελάττωση DOC	Έκλυση CO_2	Μανομετρική αναπνευ-σιομετρία	Τροποποιημένη δοκιμή ΟΟΣΑ	Κλειστή φιάλη	MITI(I)
Συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας						
σαν mg/l			100		2-10	100
mg DOC/1	10-40	10-20		10-40		
mg ThOD/1			50-100		5-10	
Συγκέντρωση εμβολίου (σε κύτταρα/1 κατά προσέγγιση)	≤ 30 mg/l SS ή ≤ 100 ml λυμάτων/l (10^7-10^8)			0,5 ml από δευτερογενή λύματα/l (10^5)	≤ 5 ml δευτερογενή λύματα/l (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Συγκέντρωση στοιχείων στο ανόργανο μέσον (σε mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 = 0,2					Κατά προτίμηση 7,0
Θερμοκρασία	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας ThoD = Θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο SS = Εναιωρούμενα στερεά

I.6.1 **Νερό για αραίωση**

Το νερό που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί γενικά σαν διαλύτης πρέπει να είναι απιονισμένο ή απεσταγμένο, απαλλαγμένο από ανασταλτικές συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών (π.χ. ιόντα Cu^{++}). Το νερό δεν πρέπει να περιέχει περισσότερο από 10 % της ποσότητας του οργανικού άνθρακα που εισάγεται από το εξεταζόμενο υλικό. Το νερό της δοκιμής είναι ανάγκη να είναι υψηλής καθαρότητας ώστε να αποφεύγονται υψηλές τιμές στα τυφλά πειράματα. Η μόλυνση μπορεί να προκύφει από εγγενείς προσμίξεις όπως επίσης και από τις ιοντοανταλλακτι-κές ρητίνες και από ουσίες που παράγονται απο την λύση βακτηρίων και αλγών. Για κάθε σειρά δοκιμών, χρησιμοποιείται μόνον μία παρτίδα νερού, ελεγμένη προηγουμένως με ανάλυση DOC. Μια τέτοια δοκιμή δεν είναι απαραίτητη για τη δοκιμή κλειστής φιάλης, αλλά η κατανάλωση οξυγόνου από το νερό πρέπει να είναι χαμηλή.

▼B

I.6.2. **Αρχικά διαλύματα ανόργανων συστατικών**

Για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής, παρασκευάζονται αρχικά διαλύματα με την κατάλληλη συγκέντρωση ανόργανων συστατικών. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα αρχικά διαλύματα που παρατίθενται παρακάτω (με διαφορετικούς συντελεστές αραίωσης) για τις μεθόδους Ελάττωσης DOC, Τροποποιημένη Δοκιμή ΟΟΣΑ, Έκλυση $C0_2$, Μανομετρική Αναπνευσιομετρία και Δοκιμή Κλειστής Φιάλης.

Οι συντελεστές αραίωσης και, για τη δοκιμή MITI, η ειδική παρασκευή του ανόργανου μέσου, αναφέρονται στα αντίστοιχα κείμενα των συγκεκριμένων δοκιμών.

Αρχικά διαλύματα:

Παρασκευάζονται τα ακόλουθα αρχικά διαλύματα, χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας.

(α)	Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4	8,50 g
	Μονόξινο φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4	21,75 g
	Δίυδρο μονόξινο φωσφορικό νάτριο, $Na_2HPO_4.2H_2O$	33,40 g
	Χλωριούχο αμμώνιο, NH_4Cl	0,50 g
	Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση μέχρι 1 λίτρο Το pH του διαλύματος θα πρέπει να είναι 7,4	
(β)	Χλωριούχο ασβέστιο, άνυδρο, $CaCl_2$	27,50 g
	ή δίυδρο χλωριούχο ασβέστιο, $CaCl_2.2\ H_2O$	36,40 g
	Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση μέχρι 1 λίτρο	
(γ)	Επτάυδρο θεϊκό μαγνήσιο, $MgSO_4.\ 7H_2O$	22,50 g
	Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση μέχρι 1 λίτρο	
(δ)	Εξάυδρος χλωριούχος σίδηρος (III), $FeCl_3.6H_2O$	0,25 g
	Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση μέχρι 1 λίτρο.	

Σημείωση: για να αποφεύγεται να παρασκευάζεται το διάλυμα αυτό αμέσως πριν από τη χρήση, προστίθεται μία σταγόνα πυκνού HCl ή 0,4 g δινατρίου άλατος του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) ανά λίτρο.

I.6.3. **Αρχικά διαλύματα χημικών ουσιών**

Για παράδειγμα, όταν η διαλυτότητα είναι μεγαλύτερη από το 1 g/l, διαλύονται 1-10 g, ανάλογα, εξεταζόμενης ουσίας ή ουσίας αναφοράς σε απιονισμένο νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο. Διαφορετικά, παρασκευάζονται αρχικά διαλύματα στο ανόργανο μέσον ή η ουσία προστίθεται απ' ευθείας στο ανόργανο μέσον. Για το χειρισμό λιγότερο ευδιάλυτων χημικών ουσιών, βλ. Παράρτημα ΙΙΙ. Πάντως, στη δοκιμή MITI (Μέθοδος Γ.4-Ε), δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ούτε διαλύτες ούτε γαλακτωματοποιητές.

▼B

I.6.4. **Εμβόλια**

Το εμβόλιο μπορεί να προέρχεται από διάφορες πηγές: ενεργοποιημένη λάσπη, αστικά λύματα (μη χλωριομένα), επιφανειακά νερά και χώματα ή από μείγμα αυτών. Στις δοκιμές της Ελάττωσης DOC, της Έκλυσης CO_2 και της Μανομετρικής Αναπνευσιομετρίας, αν χρησιμοποιείται ενεργοποιημένη λάσπη, αυτή θα πρέπει να λαμβάνεται από εγκατάσταση κατεργασίας ή μονάδα εργαστηριακής κλίμακας που δέχεται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα. Εμβόλια που προέρχονται από άλλες πηγές διαπιστώθηκε ότι δίνουν μεγαλύτερη διασπορά αποτελεσμάτων. Για την Τροποποιημένη Δοκιμή ΟΟΣΑ και τη Δοκιμή Κλειστής Φιάλης απαιτείται ένα πιο αραιό εμβόλιο χωρίς κροκιδώματα ή συσσωματώματα λάσπης και η πηγή που προτιμάται είναι τα δευτερογενή λύματα από εγκαταστάσεις κατεργασίας ή μονάδα εργαστηριακής κλίμακας οικιακών αποβλήτων. Στη δοκιμή MITI, το εμβόλιο προέρχεται από μίγμα πηγών και περιγράφεται στο κείμενο της συγκεκριμένης αυτής δοκιμής.

1.6.4.1. *Εμβόλιο από ενεργοποιημένες λάσπες*

Δείγμα ενεργοποιημένης λάσπης συλλέγεται από τη δεξαμενή αερισμού μιας εγκατάστασης κατεργασίας λυμάτων ή μονάδας εργαστηριακής κλίμακας στην οποία κατεργάζονται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα. Εάν είναι αναγκαίο, τα χονδρά σωματίδια απομακρύνονται με διήθηση μέσα από λεπτό κόσκινο και η λάσπη φυλλάσσεται σε αερόβιες συνθήκες.

Εναλλακτικά, μετά την απομάκρυνση των χονδρών σωματιδίων, η λάσπη αφήνεται να κατακαθίσει ή φυγοκε-ντρείται (π.χ. σε 1 100 g επί 10 λεπτά). Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και η συμπυκνωμένη λάσπη πλένεται με το ανόργανο διάλυμα. Η συμπικνωμένη λάσπη αιωρείται σε ανόργανο μέσον μέχρι συγκέντρωσης 3-5 g εναιωρούμενων στερεών/1 και αερίζεται όσο απαιτείται.

Η λάσπη πρέπει να λαμβάνεται από συμβατική εγκατάσταση που λειτουργεί κανονικά. Αν η λάσπη λαμβάνεται από εγκαταστάσεις κατεργασίας υψηλής ταχύτητας ή πιστεύεται ότι περιέχει αναστολείς, θα πρέπει να πλένεται. Η επαναφερθείσα σε μορφή εναιωρήματος λάσπη μετά από επισταμένη ανάμειξη, αφήνεται να κατακαθίσει ή φυγοκεντρείται, το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και η πλυμένη λάσπη επαναφέρεται σε μορφή εναιωρήματος σε πρόσθετο όγκο ανόργανου μέσου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να κριθεί ότι η λάσπη είναι απαλλαγμένη από υπερβολικό υπόστρωμα ή αναστολέα.

Αφού επιτευχθεί η πλήρης επαναιώρηση, ή στη μη κατεργασμένη λάσπη, λαμβάνεται δείγμα ακριβώς πριν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους των αιωρουμένων στερεών.

Μια άλλη εναλλακτική λύση, είναι η ομοιογενοποίηση της ενεργοποιημένης λάσπης (3-5 g αιωρούμενων στερεών/l). Η λάσπη υποβάλλεται σε κατεργασία σε μηχανικό αναμεικτη για δύο λεπτά με μεσαία ταχύτητα. Η αναμεμειγμένη λάσπη αφήνεται να κατακαθίσει για χρονικό διάστημα 30 λεπτών ή και περισσότερο εάν αυτό απαιτείται και το υγρό μεταγγίζεται για να χρησιμοποιηθεί σαν εμβόλιο σε αναλογία 10 ml/l ανόργανου μέσου.

1.6.4.2. *Άλλες πηγές εμβολίου*

Το εμβόλιο μπορεί να προέρχεται από τα δευτερογενή απόβλητα εγκαταστάσεων κατεργασίας ή μονάδας εργαστηριακής κλίμακας για οικιακά, κατά κύριο λόγο, λύματα. Συλλέγεται πρόσφατο δείγμα και διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες κατά τη διάρκεια της μεταφοράς. Αφήνεται να κατακαθίσει για 1 ώρα ή διηθείται διαμέσου χονδρού διηθητικού χαρτιού και τα μεταγγισθέντα απόβλητα ή το διήθημα διατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες για όσο χρόνο απαιτείται. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέχρι 100 ml αυτού του τύπου εμβολίου ανά λίτρο μέσου.

▼B

Μία περαιτέρω πηγή για το εμβόλιο είναι τα επιφανειακά νερά. Στην περίπτωση αυτή, συλλέγεται δείγμα από κατάλληλα επιφανειακά νερά, π.χ. ποταμούς, λίμνες και διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες όσο απαιτείται. Εφόσον χρειάζεται, το εμβόλιο συμπυκνώνεται με διήθηση ή φυγοκέντρηση.

I.6.5. **Προεγκλιματισμός εμβολίων**

Τα εμβόλια μπορούν να προεγκλιματίζονται στις πειραματικές συνθήκες, δεν μπορούν όμως να προσαρμόζονται εκ των προτέρων στην εξεταζόμενη ουσία. Ο προεγκλιματισμός συνίσταται στον αερισμό της ενεργοποιημένης λάσπης σε ανόργανο μέσον ή δευτερογενή απόβλητα επί 5-7 ημέρες σε θερμοκρασία δοκιμής. Ο προεγκλιματι-σμός βελτιώνει μερικές φορές την ακρίβεια των μεθόδων δοκιμής μειώνοντας τις τιμές του τυφλού. Δεν θεωρείται αναγκαίο να προεγκλιματίζεται το εμβόλιο M1T1.

I.6.6. **Αβιοτικοί έλεγχοι**

Όταν απαιτείται, η ενδεχόμενη αβιοτική αποικοδόμηση της εξεταζόμενης ουσίας ελέγχεται προσδιορίζοντας την απομάκρυνση του DOC, την ανάλωση οξυγόνου ή την έκλυση διοξειδίου του άνθρακα σε αποστειρωμένους ελέγχους που δεν περιέχουν εμβόλιο. Η αποστείρωση διενεργείται με διήθηση δια μέσου μεμβράνης (0,2-0,45 μικρόμετρα) ή με προσθήκη μιάς κατάλληλης τοξικής ουσίας σε κατάλληλη συγκέντρωση. Αν χρησιμοποιείται μεμβράνη διήθησης, τα δείγματα λαμβάνονται άσηπτα ώστε να διατηρηθούν αποστειρωμένα. Στις δοκιμές που μετρούν βιοαποικοδόμηση σαν απομάκρυνση του DOC, ειδικότερα με εμβόλιο ενεργοποιημένης λάσπης, πρέπει να περιλαμβάνεται και αβιοτικός έλεγχος που είναι εμβολιασμένος και δηλητηριασμένος, εκτός αν η προσρόφηση της εξεταζόμενης χημικής ουσίας έχει αποκλεισθεί εκ των προτέρων.

I.6.7. **Αριθμός φιαλών**

Ο αριθμός των φιαλών σε μια τυπική διαδικασία δοκιμής περιγράφεται κάτω από τους τίτλους κάθε δοκιμής.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον οι ακόλουθοι τύποι φιαλών:

— Για εναιώρημα δοκιμής: περιέχονται εξεταζόμενη ουσία και εμβόλιο

— Για τυφλό εμβολίου: περιέχεται μόνον εμβόλιο

— Για έλεγχο διαδικασίας: περιέχονται ουσία αναφοράς και εμβόλιο

— Για αβιοτικό στείρο έλεγχο: στείρο, περιέχεται εξεταζόμενη ουσία (βλέπε 1.6.6)

— Για έλεγχο προσρόφησης: περιέχονται εξεταζόμενη ουσία, εμβόλιο και φορέας αποστείρωσης

— Για έλεγχο τοξικότητας: περιέχονται εξεταζόμενη ουσία, ουσία αναφοράς και εμβόλιο

Ο προσδιορισμός στο εναιώρημα δοκιμής και το τυφλό εμβόλιο θα πρέπει να υποχρεωτικά να γίνεται παράλληλα. Θεωρείται σκόπιμο να γίνονται παράλληλα επίσης οι προσδιορισμοί στην άλλη φιάλη.

Αυτό μπορεί, παρ' όλα αυτά, να μην είναι πάντοτε δυνατόν. Πρέπει να εξασφαλίζεται το ότι λαμβάνονται επαρκή δείγματα ή αναγνώσεις ώστε να μπορεί να εκτιμάται το ποσοστό απομάκρυνσης στο 10 ήμερο παράθυρο.

▼B

I.7. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Στον υπολογισμό της D_t, δηλ. του ποσοστού αποικοδόμησης επί τοις εκατό, χρησιμοποιούνται οι μέσες τιμές της διπλής μέτρησης της παραμέτρου τόσο στις φιάλες δοκιμής όσο και στο τυφλό εμβολίου. Οι τύποι παρατίθενται στα κεφάλαια παρακάτω για τις συγκεκριμένες δοκιμές. Η πορεία αποικοδόμησης απεικονίζεται γραφικά και εμφανίζεται το 10 ήμερο παράθυρο. Υπολογίζεται και αναφέρεται η επί τοις εκατό απομάκρυνση που επιτυγχάνεται στο τέλος του 10 ημέρου παραθύρου και η τιμή στο οριζόντιο τμήμα της καμπύλης ή στο τέλος της δοκιμής, ανάλογα με το τι είναι προτιμότερο.

Στις αναπνευσιομετρικές δοκιμές, οι ενώσεις που περιέχουν άζωτο μπορεί να επηρεάσουν την ανάλωση οξυγόνου εξαιτίας νιτροποίησης (βλ. Παραρτήματα II και V).

I.7.1. **Αποικοδόμηση μετρούμενη μέσω προσδιορισμού του DOC**

Η εκατοστιαία αποικοδόμηση (D_t) για κάθε λαμβανόμενο δείγμα πρέπει να υπολογίζεται χωριστά για τις φιάλες που περιέχουν την εξεταζόμενη ουσία χρησιμοποιώντας την μέση τιμή διπλών μετρήσεων DOC ώστε να εκτιμηθεί η εγκυρότητα της δοκιμής (βλέπε I.5.2). Ο υπολογισμός γίνεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

όπου:

D_t = % αποικοδόμηση τη χρονική στιγμή t,

C_o = μέση αρχική συγκέντρωση DOC στο εμβολιασμένο μέσον καλλιέργειας που περιέχει την εξεταζόμενη ουσία (mg DOC/l),

C_t = μέση συγκέντρωση DOC στο εμβολιασμένο μέσον καλλιέργειας που περιέχει εξεταζόμενη ουσία τη χρονική στιγμή t (mg DOC/l),

C_{bo} = μέση αρχική συγκέντρωση DOC στο τυφλό του εμβολιασμένου ανόργανου μέσου (mg DOC/l),

C_{bt} = μέση συγκέντρωση DOC του τυφλού κατά τη χρονική στιγμή t (mg DOC/l).

Όλες οι συγκεντρώσεις μετρούνται πειραματικά.

I.7.2. **Αποικοδόμηση μετρούμενη μέσω ειδικής ανάλυσης**

Όταν υπάρχουν διαθέσιμα ειδικά αναλυτικά δεδομένα, η βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται πρωταρχικά από τον τύπο:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

όπου:

D_t = % αποικοδόμηση τη χρονική στιγμή t, κανονικά 28 ημέρες,

S_a = εναπομένουσα ποσότητα εξεταζόμενης ουσίας στο εμβολιασμένο μέσον στο τέλος της δοκιμής (mg),

S_b = εναπομένουσα ποσότητα εξεταζόμενης ουσίας στο τυφλό με νερό/μέσον στο οποίο προστέθηκε μόνον η εξεταζόμενη ουσία (mg).

▼B

I.7.3. **Αβιοτική αποικοδόμηση**

Όταν χρησιμοποιείται ένας στείρος αβιοτικός έλεγχος, στον υπολογισμό της εκατοστιαίας αβιοτικής αποικοδόμηαης χρησιμοποιείται

$$\% \text{ αβιοτική αποικοδόμηση} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

άπου:

$C_{s(o)}$ = DOC Συγκέντρωση στο στείρο έλεγχο την ημέρα 0

$C_{s(t)}$ = DOC Συγκέντρωση στο στείρο έλεγχο την ημέρα t

I.8. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— εξεταζόμενες και ουσίες αναφοράς όπως και την καθαρότητα τους·

— συνθήκες δοκιμής·

— εμβόλιο: φύση και τόπο (τόπους) δειγματοληψίας, συγκέντρωση και οποιαδήποτε κατεργασία προεγκλιμα-τισμού·

— αναλογία και φύση βιομηχανικών αποβλήτων στα λύματα, αν είναι γνωστές·

— διάρκεια και θερμοκρασία δοκιμής·

— σε περίπτωση ασθενώς διαλυτών εξεταζόμενων ουσιών, πραγματοποιηθείσα κατεργασία·

— εφαρμοσθείσα μέθοδο δοκιμής. Για οποιαδήποτε αλλαγή διαδικασίας θα πρέπει να παρέχονται οι επιστημονικοί λόγοι και επεξήγηση·

— δελτίο δεδομένων·

— οποιοδήποτε φαινόμενο αναστολής που παρατηρήθηκε·

— οποιαδήποτε παρατηρηθείσα αβιοτική αποικοδόμηση·

— συγκεκριμένα χημικά αναλυτικά δεδομένα, εφόσον υπάρχουν·

— αναλυτικά δεδομένα για τα ενδιάμεσα προϊόντα, εφόσον υπάρχουν.

— η γραφική παράσταση της επί τοις εκατό αποικοδόμησης σαν συνάρτηση του χρόνου για την εξεταζόμενη ουσία και τις ουσίες αναφοράς θα πρέπει να εμφαίνονται σαφώς η φάση υστέρησης, η φάση αποικοδόμησης, το 10 ήμερο παράθυρο και η κλίση (Παράρτημα 1). Για την γραφική παράσταση, εφόσον η δοκιμή είναι σύμφωνη με τα κριτήρια εγκυρότητας, χρησιμοποιείται ο μέσος όρος της εκατοστιαίας αποικοδόμησης στις φιάλες που περιέχουν την εξεταζόμενη ουσία·

— η επί τοις εκατό απομάκρυνση μετά το 10 ήμερο παράθυρο, στο οριζόντιο τμήμα ή στο τέλος της δοκιμής.

ΜΕΡΟΣ II. **ΔΟΚΙΜΗ ΕΛΑΤΤΩΣΗΣ DOC** (Μέθοδος Γ.4-Α)

II.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μετρημένος όγκος εμβολιασμένου ανόργανου μέσου που περιέχει γνωστή συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας (10-40 mg DOC/l) σαν αποκλειστική πηγή οργανικού άνθρακα αερίζεται στο σκοτάδι ή σε διάχυτο φως στους 22 ± 2 °C.

▼B

Η αποικοδόμηση παρακολουθείται με ανάλυση DOC σε τακτά χρονικά διαστήματα για μία περίοδο 28 ημερών. Ο βαθμός βιοαποικοδόμησης υπολογίζεται εκφράζοντας τη συγκέντρωση του απομακρυνθέντος DOC (διορθωμένη με βάση το τυφλό) σαν το εκατοστιαίο ποσοστό της υπάρχουσας αρχικά συγκέντρωσης. Ο βαθμός πρωταρχικής βιοαποικοδόμησης μπορεί να υπολογισθεί επίσης με συμπληρωματική χημική ανάλυση που πραγματοποιείται στην αρχή και στο τέλος της επώασης.

II.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

II.2.1. **Εξοπλισμός**

(α) Κωνικές φιάλες, π.χ. 250 mg έως 2 l, ανάλογα με τον όγκο που απαιτείται για την ανάλυση DOC

(β) Συσκευή ανατάραξης που δέχεται τις κωνικές φιάλες, είτε με αυτόματο έλεγχο θερμοκρασίας ή που χρησιμοποιείται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας, ικανής ισχύος ώστε να διατηρεί αερόβιες συνθήκες σε όλες τις φιάλες·

(γ) Συσκευή διήθησης, με κατάλληλες μεμβράνες·

(δ) Αναλυτής DOC

(ε) Συσκευή προσδιορισμού διαλελυμένου οξυγόνου·

(στ) Φυγόκεντρος.

II.2.2. **Προετοιμασία ανόργανου μέσου**

Για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος, βλ. I.6.2.

Αναμειγνύονται 10 ml διαλύματος (α) με 800 ml νερού αραίωσης, προστίθεται 1 ml από τα διαλύματα (β) έως (δ) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο με νερό αραίωσης.

II.2.3. **Παρασκευή και προεγκλιματισμός εμβολίου**

Το εμβόλιο μπορεί να παράγεται από μια ποικιλία πηγών: ενεργοποιημένη λάσπη λύματα αποχετεύσεων επιφανειακά νερά' χώματα ή ένα μείγμα αυτών.

Βλ. I.6.4. I.6.4.1. I.6.4.2. και I.6.5.

II.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Για παράδειγμα, σε δίλιτρες κωνικές φιάλες φέρονται ποσότητες ανόργανου μέσου όγκου 800 ml και προστίθενται επαρκείς όγκοι αρχικών διαλυμάτων της εξεταζόμενης ουσίας και των ουσιών αναφοράς σε ξεχωριστές φιάλες ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση χημικής ουσίας ισοδύναμη με 10-40 ml DOC/1. Ελέγχεται το pH· και ρυθμίζεται αν είναι ανάγκη στο 7,4. Οι φιάλες εμβολιάζονται με ενεργοποιημένη λάσπη ή άλλη πηγή εμβολίων (βλ. I.6.4.), έτσι ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση όχι μεγαλύτερη από 30 mg αιωρούμενων στερεών/1. Παρασκευάζονται επίσης με το εμβόλιο τυφλά στο ανόργανο μέσον χωρίς όμως εξεταζόμενη ή ουσία αναφοράς.

Εάν χρειάζεται, μία φιάλη χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί η πιθανή ανασταλτική επίδραση της εξεταζόμενης ουσίας, εμβολιάζοντας διάλυμα που περιέχει, στο ανόργανο μέσον, συγκρίσιμες συγκεντρώσεις της εξεταζόμενης και μιας ουσίας αναφοράς.

Επίσης, εφόσον απαιτείται, ετοιμάζεται μία ακόμη, αποστειρωμένη φιάλη για να ελεγχθεί αν η εξεταζόμενη ουσία αποικοδομείται αβιοτικώς χρησιμοποιώντας μη εμβολιασμένο διάλυμα της ουσίας (βλ. 1.6,6.).

▼B

Επιπλέον, αν υπάρχουν υποψίες ότι η εξεταζόμενη χημική ουσία προσροφάται σε σημαντικό βαθμό στο γυαλί, στη λάσπη, κ.λπ., γίνεται μία προκαταρκτική εκτίμηση για να προσδιορισθεί η πιθανή έκταση της προσρόφησης και με τον τρόπο αυτό η καταλληλότητα της δοκιμής για τη χημική ουσία (βλ. Πίνακα 1).Τοποθετείται μιά φιάλη που περιέχει την εξεταζόμενη ουσία, το εμβόλιο και τόν φορέα αποστείρωσης.

Τα διαλύματα, σε όλες τις φιάλες, συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με ανόργανο μέσον και, αφού ανακατευτούν, λαμβάνεται από κάθε φιάλη ένα δείγμα για να προσδιορισθεί η αρχική συγκέντρωση DOC (βλ. Παράρτημα II.4). Τα στόμια των φιαλών καλύπτονται, π.χ. με φύλλο αλουμινίου, έτσι ώστε να μπορεί να γίνεται ελεύθερη αναλλαγή αέρα μεταξύ φιάλης και της ατμόσφαιρας που περιβάλλει τη φιάλη. Κατόπιν, οι φιάλες εισάγονται στη συσκευή ανατάραξης για να αρχίσει η δοκιμή.

II.2.5. **Αριθμός φιαλών σε μια τυπική διαδικασία δοκιμής**

Φιάλες 1 και 2: εναιώρημα εξεταζόμενης ουσίας

Φιάλες 3 και 4: τυφλό εμβολίου

Φιάλη 5: έλεγχος διαδικασίας

κατά προτίμηση και όταν είναι απαραίτητο

Φιάλη 6: στείρος αβιοτικός έλεγχος

Φιάλη 7: έλεγχος προσρόφησης

Φιάλη 8: έλεγχος τοξικότητας

Βλέπε επίσης I.6.7.

II. **2.6. Εκτέλεση της δοκιμής**

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις DOC σε κάθε φιάλη δύο φορές σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα αρκετά κοντινά ώστε να μπορεί να προσδιορισθεί η έναρξη του 10 ήμερου παραθύρου και η επί τοις εκατό απομάκρυνση στο τέλος του 10 ήμερου παραθύρου. Για κάθε προσδιορισμό λαμβάνεται μόνον ο ελάχιστος απαιτούμενος όγκος του εναιωρήματος δοκιμής.

Πριν από τη δειγματοληψία, οι απώλειες από τις φιάλες εξαιτίας εξάτμισης αναπληρώνονται προσθέτοντας νερό αραίωσης (I.6.1) στην απαιτούμενη ποσότητα εφόσον χρειάζεται. Πριν από τη λήψη ενός δείγματος, το μέσον καλλιέργειας αναμειγνύεται καλά και εξασφαλίζεται ότι τυχόν υλικό προσκολλημένο στα τοιχώματα των δοχείων διαλύεται ή εναιωρείται πριν από τη δειγματοληψία. Αμέσως μετά τη λήψη δείγματος πρέπει να γίνει διήθηση με μεμβράνη ή φυγοκέντρηση (βλ. Παράρτημα II.4). Τα διηθημένα ή φυγοκεντρημένα δείγματα αναλύονται την ίδια ημέρα, διαφορετικά φυλάσσονται στους 2-4 ^{o}C για 48 ώρες το ανώτερο, ή κάτω από τους - 18 ^{o}C για μεγαλύτερο διάστημα.

II.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΗ

II.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Υπολογίζεται η επί τοις εκατό αποικοδόμηση τη χρονική στιγμή t όπως αναφέρεται στο I.7.1. (προσδιορισμός DOC) και, προαιρετικά, στο I.7.2. (ειδική ανάλυση).

Όλα τα αποτελέσματα καταγράφονται στα φύλλα δεδομένων.

▼B

II.3.2. **Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων**

Βλ. I.5.2.

II.3.3. **Έκθεση**

Βλ. I.8.

II.4. ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

ΔΟΚΙΜΗ ΕΛΑΤΤΩΣΗΣ DOC

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l, σαν ουσία

Αρχική συγκέντρωση στο μέσον αραίωσης, t_0: ... mg/l, σαν ουσία

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Πηγή: ...

Πραγματοποιηθείσα κατεργασία: ...

Προεγκλιματισμός, εφόσον υπήρξε: ...

Συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών στο αντιδρόν μείγμα: ... mg/l

5. **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΑΝΘΡΑΚΑ**

Αναλύτης άνθρακα: ...

	Φιάλη αρ.		DOC μετά η ημέρες (mg/I)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Εξεταζόμενη ουσία μαζί με εμβόλιο	1	a_1					
		a_2					
		a, μέσο $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, μέσο $C_{b(t)}$					

▼B

	Φιάλη αρ.		DOC μετά η ημέρες (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Τυφλό εμβολίου χωρίς εξεταζόμενη ουσία	3	C_1					
		C_2					
		c, μέσο $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, μέσο $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΑΠΕΞΕΡΓΑΣΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Φιάλη αρ.		% αποικοδόμηση μετά από η ημέρες				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Μέση (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Το D_1 και D_2 δεν πρέπει να παράγουν μέσο όρο αν υπάρχει ανάμεσά τους σοβαρή διαφορά.

Σημείωση: παρόμοιοι τύποι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ουσία αναφοράς και για τους ελέγχους τοξικότητας.

7. **ΑΒΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ** (προαιρετικός)

	Χρόνος (ημέρες)	
	0	t
DOC συγκέντρωση (mg/l) σε στείρο έλεγχο	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{\% αβιοτική απακοδόμηση} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ΕΙΔΙΚΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ** (προαιρετική)

	εναπομείνουσα ποσότητα της χημικής ουσίας στο τέλος της δοκιμής	% πρωταρχική βιοαποικοδόμηση
Στείρος έλεγχος	S_b	

▼B

	εναπομείνουσα ποσότητα της χημικής ουσίας στο τέλος της δοκιμής	% πρωταρχική βιοαποικοδόμηση
Εμβολιασμένο μέσο δοκιμής	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ. **ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΗ ΟΟΣΑ** (Μέθοδος Γ.4-Β)

ΙΙΙ.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Καθορισμένος όγκος ανόργανου μέσου που περιέχει γνωστή συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας (10-40 mg DOC/1) σαν μοναδική πηγή οργανικού άνθρακα εμβολιάζεται με 0,5 ml λυμάτων ανά λίτρο μέσου. Το μείγμα αερίζεται στο σκοτάδι ή σε διάχυτο φως στους 22 ± 2 °C.

Η αποικοδόμηση παρακολουθείται με αναλύσεις DOC κατά τακτά χρονικά διαστήματα για μία περίοδο 28 ημερών. Ο βαθμός βιοαποικοδόμησης υπολογίζεται εκφράζοντας τη συγκέντρωση του απομακρυνθέντος DOC (διορθωμένη με βάση το αποτέλεσμα του τυφλού) σαν το εκατοστιαίο ποσοστό της υπάρχουσας αρχικής συγκέντρωσης. Ο βαθμός πρωταρχικής βιοαποικοδόμησης μπορεί επίσης να υπολογισθεί με πρόσθετη χημική ανάλυση που πραγματοποιείται στην αρχή και στο τέλος της επώασης.

ΙΙΙ.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

ΙΙΙ.2.1. Εξοπλισμός

(α) Κωνικές φιάλες, π.χ. 250 ml μέχρι 2 l, ανάλογα με τον όγκο που απαιτείται για την ανάλυση DOC

(β) Συσκευή ανατάραξης που δέχεται τις κωνικές φιάλες, είτε με αυτόματο έλεγχο θερμοκρασίας ή που χρησιμοποιείται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας, και ικανής ισχύος ώστε να διατηρεί αερόβιες συνθήκες σε όλες τις φιάλες·

(γ) Συσκευή διήθησης, με κατάλληλες μεμβράνες·

(δ) Αναλύτης DOC·

(ε) Συσκευή προσδιορισμού διαλελυμένου οξυγόνου·

(στ) Φυγόκεντρος.

ΙΙΙ.2.2. **Προετοιμασία ανόργανου μέσου**

Για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος, βλ. Ι.6.2.

Αναμειγνύονται 10 ml διαλύματος (α) με 800 ml νερού αραίωσης, προστίθεται 1 ml από τα διαλύματα (β) έως (δ) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο με νερό αραίωσης.

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται μόνον 0,5 ml λυμάτων/λίτρο σαν εμβόλιο και κατά συνέπεια μπορεί το ανόργανο μέσο να χρειάζεται να ενισχυθεί με ιχνοστοιχεία και παράγοντες ανάπτυξης. Αυτό επιτυγχάνεται προσθέτοντας 1 ml από καθένα από τα ακόλουθα διαλύματα ανά λίτρο τελικού μέσου:

▼B

Διάλυμα ιχνοστοιχείων:

Τετράυδρο θειικό μαγγάνιο, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Βορικό οξύ, H_3BO_3	57,2 mg
Επτάυδρος θειικός ψευδάργυρος, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Επταμολυβδαινικό αμμώνιο $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Χηλική ένωση Fe ($FeCl_3$-αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ)	100,0 mg

Τα ανωτέρω διαλύονται και συμπληρώνονται μέχρι όγκου 1 000 ml με νερό αραίωσης.

Διάλυμα βιταμινών:

Εκχύλισμα ζύμης	15,0 mg

Το εκχύλισμα ζύμης διαλύεται σε 100 ml νερό. Αποστειρώνεται περνώντας το διαμέσου μεμβράνης 0,2 μικρών ή παρασκευάζεται πρόσφατα.

III.2.3. **Παρασκευή και προεγκλιματισμός εμβολίου**

Το εμβόλιο παράγεται από δευτερογενή λύματα εγκατάστασης κατεργασίας ή εργαστηριακής μονάδας που δέχεται κύρια οικιακά απόβλητα. Βλ. I.6.4.2. και I.6.5.

Χρησιμοποιούνται 0,5 ml ανά λίτρο ανόργανου μέσου.

III.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Για παράδειγμα, σε δίλιτρες κωνικές φιάλες φέρονται ποσότητες ανόργανου μέσου όγκου 800 ml και προστίθενται επαρκείς ποσότητες αρχικών διαλυμάτων της εξεταζόμενης και της ουσίας αναφοράς σε ξεχωριστές φιάλες ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση χημικής ουσίας ισοδύναμη με 10-40 mg DOC/1. Ελέγχεται η τιμή του pH και ρυθμίζεται, αν είναι ανάγκη, στο 7,4. Οι φιάλες εμβολιάζονται με λύματα αποχετεύσεων σε ποσοστό 0,5 ml/λίτρο (βλ. I.6.4.2.). Παρασκευάζονται επίσης μάρτυρες εμβολίου στο ανόργανο μέσον αλλά χωρίς εξεταζόμενη ουσία ή ουσία αναφοράς.

Αν χρειάζεται, χρησιμοποιείται μία φιάλη για να ελέγχεται· η πιθανή ανασταλτική επίδραση της εξεταζόμενης ουσίας, εμβολιάζοντας ένα διάλυμα περιέχον, στο ανόργανο μέσον, συγκρίσιμες συγκεντρώσεις της εξεταζόμενης ουσίας και μιας ουσίας αναφοράς.

Επίσης, αν απαιτείται, ετοιμάζεται μία ακόμη, αποστειρωμένη φιάλη για να ελεγχθεί αν η εξεταζόμενη ουσία αποικοδομείται αβιοτικά χρησιμοποιώντας μη εμβολιασμένο διάλυμα της ουσίας (βλ. 1.6.6.).

Επιπλέον, αν υπάρχουν υποψίες ότι η εξεταζόμενη χημική ουσία προσροφάται σε σημαντικό βαθμό στο γυαλί, στη λάσπη, κ.λπ., γίνεται μία προκαταρκτική εκτίμηση για να προσδιορισθεί η πιθανή έκταση της προσρόφησης και με τον τρόπο αυτό η καταλληλότητα της δοκιμής για την χημική ουσία (βλ. Πίνακα 1). Τοποθετείται μια φιάλη που περιέχει την εξεταζόμενη ουσία, το εμβόλιο και τον φορέα αποστείρωσης.

Τα διαλύματα σε όλες τις φιάλες συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με ανόργανο μέσο και, αφού ανακατευτούν, λαμβάνεται από κάθε φιάλη ένα δείγμα για να προσδιορισθεί η αρχική συγκέντρωση DOC (βλ. Παράρτημα H.4). Τα στόμια των φιαλών καλύπτονται, π.χ. με φύλλο αλουμινίου, έτσι ώστε να μπορεί να γίνεται ελεύθερα ανταλλαγή του αέρα μεταξύ φιάλης και ατμόσφαιρας. Κατόπιν, οι φιάλες εισάγονται στη συσκευή αναταραξης για να αρχίσει η δοκιμή.

▼B

III.2.5. **Αριθμός φιαλών σε μια τυπική διαδικασία δοκιμής**

Φιάλες 1 και 2: εναιώρημα εξεταζόμενης ουσίας

Φιάλες 3 και 4: τυφλό εμβολίου

Φιάλη 5: έλεγχος διαδικασίας

και κατά προτίμηση όταν είναι απαραίτητο

Φιάλη 6: στείρος αβιοτικός έλεγχος

Φιάλη 7: έλεγχος προσρόφησης

Φιάλη 8: έλεγχος τοξικότητας

Βλέπε επίσης I.6.7.

III.2.6. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις DOC σε κάθε φιάλη δύο φορές σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα αρκετά κοντινά ώστε να μπορεί να προσδιορισθεί η έναρξη του 10 ήμερου παραθύρου και η επί τοις εκατό απομάκρυνση στο τέλος του 10 ήμερου παραθύρου. Για κάθε προσδιορισμό λαμβάνεται μόνον ο ελάχιστος απαιτούμενος όγκος του εναιωρήματος δοκιμής.

Πριν από τη δειγματοληφία, οι απώλειες από τις φιάλες εξαιτίας εξάτμισης αναπληρώνονται προσθέτοντας νερό αραίωσης (I.6.1.) στην απαιτούμενη ποσότητα εφόσον χρειάζεται. Πριν από τη λήψη ενός δείγματος, το μέσον καλλιέργειας αναμειγνύεται καλά και διασφαλίζεται ότι τυχόν υλικό προσκολλημένο στα τοιχώματα των φιαλών διαλύεται ή επαναφέρεται σε εναιώρηση πριν από τη δειγματοληψία. Αμέσως μετά τη λήψη δείγματος πρέπει να γίνει διήθηση από μεμβράνη ή φυγοκέντρηση {βλ. Παράρτημα II.4). Τα διηθημένα ή φυγοκεντρημένα δείγματα αναλύονται την ίδια ημέρα, διαφορετικά φυλάσσονται στους 2-4 ºC για 48 το πολύ ώρες, ή κάτω από τούς -18 ºC για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

III.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

III.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Υπολογίζεται η επί τοις εκατό αποικοδόμηση τη χρονική στιγμή t όπως αναφέρεται στο I.7.1. (προσδιορισμός DOC) και, προαιρετικά, στο I.7.2. (ειδική ανάλυση).

Όλα τα αποτελέσματα καταγράφονται στα φύλλα δεδομένων.

III.3.2. Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων

Βλ. I.5.2.

III.3.3. Έκθεση

Βλ. I.8.

III.4. ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΗ ΟΟΣΑ

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

▼B

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l σαν ουσία

Αρχική συγκέντρωση στο μέσον αραίωσης, t_0: ... mg/l σαν ουσία

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Πηγή: ...

Πραγματοποιηθείσα κατεργασία: ...

Προεγκλιματισμός, εφόσον υπήρξε: ...

Συγκέντρωση αιωρουμένων στερεών στο αντιδρόν μείγμα: ... mg/l

5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΑΝΘΡΑΚΑ

Αναλυτής άνθρακα: ...

	Φιάλη αρ.		DOC μετά n ημέρες (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Εξεταζόμενη ουσία μαζί με εμβόλιο	1	a_1					
		a_2					
		a, μέσο $^{C}a(t)$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, μέσο $^{C}b(t)$					
Τυφλο εμβολίου χωρίς εξεταζόμενη ουσία	3	c_1					
		c_2					
		c, μέσο $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, μέσο $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΑΠΕΞΕΡΓΑΣΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Φιάλη αρ.		% αποικοδόμηση μετά από n ημέρες				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Φιάλη αρ.		% αποικοδόμηση μετά από n ημέρες				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Μέση (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Το D_1 και D_2 δεν πρέπει να παράγουν μέσο όρο αν υπάρχει ανάμεσά τους σοβαρή διαφορά.

Σημείωση: παρόμοιοι τύποι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ουσία αναφοράς και για τους ελέγχους τοξικότητας.

7. **ΑΒΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ** (προαιρετικός)

	Χρόνος (ημέρες)	
	0	τ
DOC συγκέντρωση (mg/l) σε στείρο έλεγχο	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ αβιοτική αποικοδόμηση} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ΕΙΔΙΚΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ** (προαιρετική)

	εναπομείνασα ποσότητα της χημικής ουσίας στο τέλος της δοκιμής	% πρωταρχική αποικοδόμηση
Στείρος έλεγχος	S_b	
Εμβολιασμένο μέσο δοκιμής	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ΜΕΡΟΣ IV. ΔΟΚΙΜΗ ΕΚΑΥΣΗΣ CO_2 (Μέθοδος Γ.4-Γ)

IV.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Καθορισμένος όγκος εμβολιασμένου ανόργανου μέσου με γνωστή συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας (10-20 mg DOC ή TOC/l) σαν η αποκλειστική πηγή οργανικού άνθρακα αερίζεται διοχετεύοντας με ελεγχόμενη ταχύτητα αέρα απαλλαγμένο από διοξείδιο του άνθρακα στο σκοτάδι ή στο διάχυτο φώς. Η αποικοδόμηση παρακολουθείται για μία περίοδο 28 ημερών προσδιορίζοντας το παραγόμενο διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο παγιδεύεται σε υδροξείδιο του βαρίου ή νατρίου και το οποίο μετριέται με ογκομέτρηση του εναπομείνοντος υδροξειδίου ή σαν ανόργανος άνθρακας. Η ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται από την εξεταζόμενη χημική ουσία (διορθωμένη με βάση το αποτέλεσμα του τυφλού) εκφράζεται σαν το εκατοστιαίο ποσοστό του $ThCO_2$. Ο βαθμός βιοαποικοδόμησης μπορεί επίσης να υπολογισθεί με πρόσθετη ανάλυση DOC που πραγματοποιείται στην αρχή και στο τέλος της επώασης.

▼B

IV.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

IV.2.1. **Εξοπλισμός**

(α) Φιάλες, 2-5 λίτρων, με σωλήνα προσαγωγής αέρα που σχεδόν αγγίζει τον πυθμένα και αντίστοιχη έξοδο·

(β) Μαγνητικοί αναδευτήρες, όταν αξιολογούνται ασθενώς διαλυτικές χημικές ουσίες·

(γ) Φιάλες απορρόφησης αερίου·

(δ) Διάταξη ελέγχου μέτρησης της ροής του αέρα.

(ε) Συσκευή δέσμευσης διοξειδίου του άνθρακα, γτα την παραγωγή αέρα που να είναι πλήρως απαλλαγμένος από διοξείδιο του άνθρακα εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μείγμα οξυγόνου απαλλαγμένο από CO_2 και αζώτου απαλλαγμένο από CO_2, προερχόμενα από κυλίνδρους αερίων, στις σωστές αναλογίες (20 % O_2: 80 % N_2)·

(στ) Διάταξη προσδιορισμού διοξειδίου του άνθρακα, είτε ογκομετρικά είτε με κάποια μορφή αναλυτού ανόργανου άνθρακα

(ζ) Διάταξη διήθησης με μεμβράνη (προαιρετική)'

(η) Αναλυτής DOC (προαιρετικός).

IV.2.2. ***Προετοιμασία ανόργανου μέσου***

Για την ετοιμασία των αρχικών διαλυμάτων, βλ. I.6.2.

Αναμειγνύονται 10 ml διαλύματος (α) με 800 ml νερό αραίωσης, προστίθεται 1 ml από τα διαλύματα (β) έως (δ) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο με νερό αραίωσης.

IV.2.3. **Ετοιμασία και προεγκλιματισμός εμβολίου**

Το εμβόλιο παράγεται από ποικιλία πηγών: ενεργοποιημένη λάσπη λύματα αποχετεύσεων επιφανειακά νερά χώματα ή από μείγματα αυτών.

Βλέπε I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. και I.6.5.

IV.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Σαν παράδειγμα, οι τιμές όγκου και βάρους που αναφέρονται πιο κάτω, αντιστοιχούν σε πεντάλιτρες φιάλες που περιέχουν 3 λίτρα εναιωρήματος. Αν χρησιμοποιηθούν μικρότεροι όγκοι οι τιμές τροποποιούνται ανάλογα, πρέπει όμως να εξασφαλίζεται ότι το σχηματιζόμενο διοξείδιο του άνθρακα θα μπορεί να μετρηθεί σωστά.

Σε κάθε πεντάλιτρη φιάλη προστίθενται 2 400 ml ανόργανου μέσου. Προστίθεται ο κατάλληλος όγκος από την παρασκευασθείσα ενεργοποιημένη λάσπη (βλ. I.6.4.1. και I.6.5.) ώστε να ληφθεί συγκέντρωση εναιωρούμενων στερεών όχι μεγαλύτερη από 30 mg/1 στον τελικό όγκο των 3 λίτρων του εμβολιασμένου μείγματος. Εναλλακτικά, πρώτα αραιωνεται η παρασκευασμένη λάσπη ώστε να ληφθεί εναιώρημα 500-1 000 mg/1 στο ανόργανο μέσον προτού προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα στο περιεχόμενο της πεντάλιτρης φιάλης έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 30 mg/l με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται μεγαλύτερη ακρίβεια. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες πηγές εμβολίου (βλ. I.6.4.2.).

Στα εμβολιασμένα αυτά μείγματα εμφυσάται όλη τη νύκτα αέρας απαλλαγμένος από $C0_2$ ώστε να καθαρισθεί το σύστημα από CO_2.

▼B

Προστίθεται η εξεταζόμενη ουσία και η ουσία αναφοράς, ξεχωριστά, σαν γνωστοί όγκοι αρχικών διαλυμάτων, σε αντίστοιχες φιάλες ώστε να επιτευχθούν συγκεντρώσεις, μαζί με τις προστεθείσες ουσίες, από 10 έως 20 mg DOC ή TOC/l σε ορισμένες φιάλες δεν προστίθεται ουσία ώστε να χρησιμεύσουν σαν εμβολιασμένοι μάρτυρες. Οι ασθενώς διαλυτές εξεταζόμενες ουσίες προστίθενται απ' ευθείας στις φιάλες με βάση τον όγκο ή το βάρος ή ακολουθείται η διαδικασία του Παραρτήματος ΙΙΙ.

Εφόσον απαιτείται, μία φιάλη χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί πιθανή ανασταλτική επίδραση της εξεταζόμενης ουσίας, προσθέτοντας και τις εξεταζόμενες και τις ουσίες αναφοράς στην ίδια συγκέντρωση με εκείνη των άλλων φιαλών.

Επίσης, εφόσον απαιτείται, χρησιμοποιείται μία στείρα φιάλη για να ελεγχθεί μήπως η εξεταζόμενη ουσία αποικοδομείται αβιοτικά χρησιμοποιώντας μη εμβολιασμένο διάλυμα της ουσίας (βλ. 1.6.6). Αποστειρώνεται με προσθήκη μιας τοξικής ουσίας στην κατάλληλη συγκέντρωση.

Ο όγκος των εναιωρημάτων σε όλες τις φιάλες συμπληρώνεται μέχρι τα 3 λίτρα προσθέτοντας ανόργανο μέσον στο οποίο έχει εμφυσηθεί προηγουμένως αέρας απαλλαγμένος από CO_2. Προαιρετικά, μπορούν να ληφθούν δείγματα για ανάλυση DOC (βλ. Παράρτημα ΙΙ.4.) και/ή ειδική ανάλυση. Οι φιάλες προσρόφησης συνδέονται με τις εξόδους αέρα των φιαλών.

Αν χρησιμοποιηθεί υδροξείδιο του βαρίου, σε κάθε πεντάλιτρη φιάλη συνδέονται εν σειρά τρεις φιάλες προσρόφησης που κάθε μία περιέχει 100 ml διαλύματος υδροξειδίου του βαρίου 0,0125 Μ. Το διάλυμα δεν πρέπει να περιέχει ίζημα θειικών και ανθρακικών ενώ η ισχύς του πρέπει να προσδιορίζεται αμέσως πριν από τη χρήση του. Αν χρησιμοποιηθεί υδροξείδιο του νατρίου, συνδέονται δύο παγίδες από τις οποίες η δεύτερη προορίζεται για να ελέγχεται αν έχει δεσμευθεί όλο το διοξείδιο του άνθρακα στην πρώτη. Ιδιαίτερα κατάλληλες είναι οι φιάλες προσρόφησης που είναι εφοδιασμένες με πώματα φιαλών ορού. Σε κάθε φιάλη προστίθενται 200 ml υδροξειδίου του νατρίου 0,05 Μ, ποσότητα που αρκεί για την προσρόφηση όλης της ποσότητας διοξειδίου του άνθρακα που εκλύεται όταν αποικοδομηθεί πλήρως η εξεταζόμενη ουσία. Το διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, ακόμη κι όταν είναι πρόσφατα παρασκευασμένο, περιέχει ίχνη ανθρακικών. Αυτό διορθώνεται αφαιρώντας τα ανθρακικά του τυφλού.

IV.2.5. **Αριθμός φιαλών σε μία τυπική διαδικασία δοκιμής**

Φιάλες 1 και 2: εναιώρημα εξεταζόμενης ουσίας

Φιάλες 3 και 4: τυφλό εμβολίου

Φιάλη 5: έλεγχος διαδικασίας

και κατά προτίμηση όταν είναι απαραίτητο

Φιάλη 6: στείρος αβιοτικός έλεγχος

Φιάλη 7: έλεγχος προσρόφησης

Φιάλη 8: έλεγχος τοξικότητας

Βλέπε επίσης 1.6.7.

IV.2.6. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Η δοκιμή αρχίζει διοχετεύοντας αέρα απαλλαγμένο από $C0_2$ διαμέσου των εναιωρημάτων με ρυθμό παροχής 30-100 ml/min. Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε CO_2 λαμβάνονται περιοδικά δείγματα προσροφημένου διοξειδίου του άνθρακα. Τις πρώτες δέκα ημέρες συνιστάται οι αναλύσεις να πραγματοποιούνται κάθε δεύτερη ή τρίτη ημέρα και κατόπιν κάθε πέμπτη ημέρα μέχρι την 28η ημέρα έτσι ώστε να μπορεί να πιστοποιηθεί η περίοδος του 10 ήμερου παραθύρου.

▼B

Την 28η ημέρα, λαμβάνονται δείγματα (προαιρετικά! για ανάλυση DOC και/ή ειδική ανάλυση, μετριέται το pH των εναιωρημάτων και προστίθεται 1 ml πυκνού υδροχλωρικού οξέος σε κάθε φιάλη. Στις φιάλες διοχετεύεται όλη τη νύκτα αέρας για να απομακρυνθεί το διοξείδιο του άνθρακα που υπάρχει στα εξεταζόμενα εναιωρήματα. Την 29η ημέρα, πραγματοποιείται η τελευταία ανάλυση του εκλυόμενου διοξειδίου του άνθρακα.

Τις ημέρες που πραγματοποιείται η μέτρηση του CO_2, η πλησιέστερη στη φιάλη παγίδα υδροξειδίου του βαρίου αποσυνδέεται και το διάλυμα του υδροξειδίου τιτλοδοτείται με HCl 0,05 M χρησιμοποιώντας σαν δείκτη φαινολοφθαλίνη. Οι εναπομένουσες φιάλες προσρόφησης μετακινούνται μία θέση πλησιέστερα στη φιάλη και στο απώτερο άκρο της σειράς τοποθετείται μιά νέα παγίδα περιέχουσα 100 ml πρόσφατα παρασκευασθέντος υδροξειδίου του βαρίου 0,0125 M. Οι τιτλοδοτήσεις γίνονται ανάλογα με το πότε κρίνεται απαραίτητο, π.χ., όταν εμφανίζεται σημαντική ποσότητα ιζήματος στην πρώτη παγίδα και προτού εμφανισθεί ίζημα στη δεύτερη, ή τουλάχιστον μιά φορά την εβδομάδα. Εναλλακτικά, όταν χρησιμοποιείται σαν μέσον προσρόφησης το NaOH, λαμβάνεται με σύριγγα μικρό δείγμα (ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του χρησιμοποιούμενου αναλυτή άνθρακα) του διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου από τη φιάλη προσρόφησης που είναι πλησιέστερα στη φιάλη δοκιμής. Το δείγμα εισάγεται στο τμήμα IC του αναλυτή άνθρακα για τον απευθείας προσδιορισμό του εκλυθέντος διοξειδίου του άνθρακα.

Το περιεχόμενο της δεύτερης παγίδας υποβάλλεται σε ανάλυση στο τέλος μόνον της δοκιμής ώστε να γίνουν τυχόν διορθώσεις εφόσον έχει διαφύγει στη δεύτερη παγίδα ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα.

IV.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

IV.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Η ποσότητα του CO_2 που δεσμεύεται σε φιάλη προσρόφησης μπορεί να υπολογισθεί, μετά την τιτλοδότηση, με τον ακόλουθο τύπο:

$$mg\ CO_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

όπου:

V = όγκος HCl που απαιτήθηκε για την ογκομέτρηση των 100 ml στη φιάλη προσρόφησης (ml),

C_B = συγκέντρωση του διαλύματος υδροξειδίου του βαρίου (M),

C_A = συγκέντρωση του διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (M),

εάν η C_B είναι 0,0125 M και C_A είναι 0,05 M, η τιτλοδότηση των 100 ml υδροξειδίου του βαρίου απαιτεί 50 ml και το βάρος του CO_2 δίνεται από τον τύπο:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI titrated} = 1,1 \times \text{ml HCI}$$

Έτσι, στην περίπτωση αυτή, για την μετατροπή του όγκου του απαιτηθέντος HC1 σε mg παραχθέντος CO_2 ο συντελεστής είναι 1,1.

Υπολογίζεται το βάρος του CO_2 που παρήχθη μόνο από το εμβόλιο και από το εμβόλιο μαζί με την εξεταζόμενη χημική ουσία χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες τιμές τιτλοδότησης και η διαφορά είναι το βάρος του CO_2 που παρήχθη από τη χημική ουσία μόνη της.

Για παράδειγμα, άν το εμβόλιο μόνο του παρέχει όγκο τιτλοδότησης 48 ml και το εμβόλιο μαζί με τη χημική ουσία παρέχει 45 ml, τότε

CO_2 από εμβόλιο = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 από το εμβόλιο μαζί με χημική ουσία = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

και έτσι το βάρος του CO_2 που παράγεται από την εξεταζόμενη ουσία είναι 3,3 mg.

Η βιοαποικοδόμηση επί τοις εκατό υπολογίζεται με τον τύπο:

$$\% \text{ degradation} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ produced} \times 100}{ThCO_2 \times \text{ mg test chemical added}},$$

η,

$$\% \text{ degradation} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ produced} \times 100}{\text{mg TO added in test} \times 3,67}$$

όπου το 3,67 είναι ο συντελεστή; μετατροπής (44/12; του άνθρακα σε διοξείδιο του άνθρακα.

Η επί τοις εκατό αποικοδόμηση μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα υπολογίζεται προαθέτοντας το ποσοστό των τιμών $ThCO_2$ που υπολογίζονται για κάθε μια από τις ημέρες, μέχρι τη χρονική στιγμή, κατά την οποία έγινε η μέτρηση.

Στην περίπτωση φιαλών προσρόφησης με υδροξείδιο του νατρίου, η ποσότητα του παραγομένου διοξειδίου του άνθρακα υπολογίζεται, εκφρασμένη σε IC (mg), πολλαπλασιάζοντας τη συγκέντρωση του IC στο μέσον προσρόφησης επί τον όγκο του μέσου προσρόφησης.

Η επί τοις εκατό αποικοδόμηση υπολογίζεται με τον τύπο:

$$\% \text{ of } ThCO_2 = \frac{\text{mg IC flask} - \text{mg IC blank}}{\text{MG TOC added as test chemical}} \times 100$$

Οι τιμές του απομακρυνθέντος DOC (προαιρετικά) υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο 1.7. Οι τιμές αυτές καθώς και όλα τα άλλα αποτελέσματα καταγράφονται στα φύλλα δεδομένων.

IV.3.2. **Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων**

Η περιεκτικότητα σε IC του εναιωρήματος της εξεταζόμενης χημικής ουσίας στο ανόργανο μέσον στην αρχή της δοκιμής πρέπει να είναι μικρότερη του 5 % του TC και η ολική έκλυση CO_2 στο τυφλό στο τέλος της δοκιμής δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει τα 40 mg/l μέσου. Εάν ληφθούν τιμές μεγαλύτερες από 70 mg CO_2/l, θα πρέπει να γίνει επανεξέταση των δεδομένων και της πειραματικής τεχνικής.

Βλ. επίσης I.5.2.

IV.3.3. **Έκθεση**

Βλ. I.8.

IV.4. ΦΥΛΛΟ ΔΕΛΟΜΕΝΩΝ

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

KOHLENDIOXIDENTWICKLUNGSTEST

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l σαν ουσία

▼B

Αρχική

συγκέντρωση στο ανόργανο μέσον: ... mg/l σαν ουσία

Συνολική

ποσότητα C προστειθέμενη στη φιάλη: ... mg C

$ThCO_2$: ... mg CO_2

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Πηγή: ...

Πραγματοποιηθείσα κατεργασία: ...

Προεγκλιματισμός, εφόσον υπήρξε: ...

Συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών στο αντιδρόν μείγμα: ... mg/l

5. **ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ**

Μέθοδος: $Ba(OH)_2$/NaOH/άλλα ...

Χρόνος (ημέρα)	Σχηματισθέν CO_2 Δοκιμή (mg)		Σχηματισθέν CO_2 Τυφλό (mg)		Σχηματισθέν CO_2 αθροιστικό (mg) (δοκιμή μείον τυφλό μέσον)		% $ThCO_2$ αθροιστικό $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	μέση	3 / 4	μέση	1	2	1	2	μέσο
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Σημείωση: για την ουσία αναφοράς και για τους ελέγχους τοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν παρόμοιες διατάξεις.

6. **ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΘΡΑΚΑ** (προαιρετική)

Αναλυτής άνθρακα: ...

Χρόνος(ημέρα)	Τυφλό mg/l	Εξεταζόμενη ουσία mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) ή στο τέλος της επώασης.

▼B

$$\% \text{ DOC απομακαρυνθείς} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ** (προαιριτική)

$$\% \text{ αβιοτική αποικοδόμηση} = \frac{CO_2 \text{ Σχηματισθέν στείρα φιάλη μετά 28 ημέρες (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

ΜΕΡΟΣ V. **ΔΟΚΙΜΗ ΜΑΝΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΙΟΜΕΤΡΙΑΣ** (Μέθοδος Γ.4-Δ)

V.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μετρημένος όγκος εμβολιασμένου ανόργανου μέσου με γνωστή συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας (100 mg/l εξεταζόμενη ουσία ώστε να λαμβάνονται τουλάχιστον 50-100 mg ThOD/l) σαν η μόνη και αποκλειστική πηγή οργανικού άνθρακα, αναδεύεται σε κλειστή φιάλη σε σταθερή θερμοκρασία (± 1 °C ή και λιγότερο) για χρονικό διάστημα μέχρι 28 ημέρες. Η κατανάλωση οξυγόνου προσδιορίζεται είτε μετρώντας την ποσότητα οξυγόνου (που παράγεται ηλεκτρολυτικά) που απαιτείται για να διατηρηθεί σταθερός ο όγκος των αερίων στην αναπνευσιομε-τρική φιάλη είτε από την αλλαγή του όγκου ή της πίεσης (ή και συνδυασμού των δύο) στη συσκευή. Το εκλυόμενο διοξείδιο του άνθρακα προσροφάται σε διάλυμα υδροξειδίου του καλίου ή σε άλλο κατάλληλο προσροφητικό μέσο. Η ποσότητα οξυγόνου που αναλώνεται από την εξεταζόμενη ουσία (διορθωμένη σε σχέση με την ανάλωση στο τυφλό, το οποίο διεξάγεται παράλληλα) εκφράζεται σαν το εκατοστιαίο ποσοστό του ThOD ή COD. Προαιρετικά, πρωτογενής βιοαποικοδόμηση μπορεί επίσης να υπολογισθεί με συμπληρωματική ειδική ανάλυση DOC πραγματοποιούμενη στην αρχή και στο τέλος της επώασης και στη φάση της τελικής βιοαποικοδόμησης.

V.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

V.2.1. **Εξοπλισμός**

(α) κατάλληλο αναπνευσιόμετρο·

(β) διάταξη ελέγχου θερμοκρασίας, με ανοχή ± 1 °C ή λιγότερο·

(γ) διάταξη διήθησης με μεμβράνη (προαιρετική)·

(δ) αναλυτής άνθρακα (προαιρετικός).

V.2.2. **Προετοιμασία του ανόργανου μέσου**

Για την ετοιμασία των αρχικών διαλυμάτων, βλ. Ι.6.2.

Αναμειγνύονται 10 ml διαλύματος (α) με 800 ml νερό αραίωσης, προστίθεται 1 ml από τα διαλύματα (β) έως (δ) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι το 1 λίτρο με νερό αραίωσης.

V.2.3. **Παρασκευή και προεγκλιματισμός εμβολίου**

Το εμβόλιο παράγεται από ποικιλία πηγών: ενεργοποιημένη λάσπη·λύματα αποχετεύσεων·επιφανειακά νερά·χώματα ή από μείγματα αυτών.

Βλέπε Ι.6.4., Ι.6.4.1., Ι.6.4.2. και Ι.6.5.

V.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Παρασκευάζονται διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς, ξεχωριστά, σε ανόργανο μέσον που να αντιστοιχούν σε συγκέντρωση, κανονικά, 100 mg ουσίας/l (που αντιστοιχεί σε 50-100 mg ThOD/l τουλάχιστον), χρησιμοποιώντας αρχικά διαλύματα.

▼B

Υπολογίζεται το ThOD βάσει του σχηματισμού αμμωνιακών αλάτων εκτός κι αν αναμένεται νιτροποίηση, οπότε ο υπολογισμός θα πρέπει να βασίζεται στο σχηματισμό νιτρικών (βλ. Παράρτημα II.2.)

Προσδιορίζονται οι τιμές ρΗ και, εφόσον χρειάζεται, ρυθμίζονται στο 7,4 ± 0,2.

Ασθενώς διαλυτές ουσίες θα πρέπει να προστίθενται σε ένα μεταγενέστερο στάδιο (βλ. παρακάτω).

Εάν πρέπει να προσδιορισθεί η τοξικότητα της εξεταζόμενης ουσίας, παρασκευάζεται ένα ακόμη διάλυμα σε ανόργανο μέσον που περιέχει τόσο την εξεταζόμενη ουσία όσο και την ουσία αναφοράς με τις ίδιες συγκεντρώσεις όπως και στα ατομικά διαλύματα.

Εάν απαιτείται να μετρηθεί η φυσικοχημική ανάλωση οξυγόνου, παρασκευάζεται διάλυμα της εξεταζόμενης ουσίας που αντιστοιχεί, κανονικά, σε 100 mg ThOD/l και το οποίο αποστειρώνεται με την προσθήκη κατάλληλης τοξικής ουσίας. (βλ. I.6.6.).

Σε διπλές τουλάχιστον φιάλες, φέρεται ο αναγκαίος όγκος διαλυμάτων εξεταζόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς. Σε άλλες φιάλες φέρεται μόνον ανόργανο μέσον (σαν μάρτυρας εμβολίου) και, εφόσον απαιτείται, το μεικτό διάλυμα εξεταζόμενης/ουσίας αναφοράς και το στείρο διάλυμα.

Εάν η εξεταζόμενη ουσία είναι ασθενώς διαλυτή, η ουσία προστίθεται απ ευθείας στο στάδιο αυτό με βάση το βάρος ή τον όγκο ή ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο Παράρτημα III. Προστίθεται υδροξείδιο του καλίου, σφαιρίδια νατρασβέστου ή άλλο προσροφητικό μέσον στις φιάλες προσρόφησης του CO_2.

V.2.5. **Αριθμός φιαλών σε μία τυπική διαδικασία δοκιμής**

Φιάλες 1 και 2: εναιώρημα εξεταζόμενης ουσίας

Φιάλες 3 και 4: τυφλό εμβολίου

Φιάλη 5: έλεγχος διαδικασίας

και κατά προτίμηση όταν είναι απαραίτητο

Φιάλη 6: στείρος αβιοτικός έλεγχος

Φιάλη 7: έλεγχος τοξικότητας

Βλέπε επίσης 1.6.7.

V.2.6. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Οι φιάλες αφήνονται να φθάσουν στην επιθυμητή θερμοκρασία και αυτές που πρέπει εμβολιάζονται με παρασκευασθείσα ενεργοποιημένη λάσπη ή άλλη πηγή εμβολίου έτσι ώστε να ληφθεί συγκέντρωση αιωρουμένων στερεών που να μην είναι μεγαλύτερη από 30 mg/l. Η όλη διάταξη συναρμολογείται, τίθεται σε λειτουργία ο αναδευτήρας και ελέγχεται η στεγανότητα και αρχίζει η μέτρηση της ανάλωσης οξυγόνου. Συνήθως δεν χρειάζεται καμία άλλη ιδιαίτερη πρόνοια εκτός από το να λαμβάνονται οι αναγκαίες μετρήσεις και να γίνονται καθημερινοί έλεγχοι για να διαπιστώνεται αν διατηρούνται η σωστή θερμοκρασία και η κατάλληλη ανάδευση.

Η ανάλωση του οξυγόνου υπολογίζεται από τις μετρήσεις που γίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα, χρησιμοποιώντας τις μευΟυΟυς που αναφέρει ο κατασκευαστής του εξοπλισμού. Στο τέλος της επώασης, που είναι κανονικά 28 ημέρες, μετριέται το ρΗ του περιεχομένου των φιαλών, ιδιαίτερα αν οι αναλώσεις οξυγόνου είναι μικρότερες ή μεγαλύτερες από την $ThOD_{NH4}$ (για ενώσεις που περιέχουν άζωτο).

▼B

Εφόσον απαιτείται, στην αρχή και στο τέλος, λαμβάνονται από τις αναπνευσιομετρικές φιάλες δείγματα, για ανάλυση DOC ή ειδικής χημικής ουσίας (βλ. Παράρτημα II.4). Στην αρχική δειγματολειφία, εξασφαλίζεται ότι ο όγκος του εξεταζόμενου εναιωρήματος που παραμένει στη φιάλη είναι γνωστός. Όταν το οξυγόνο καταναλώνεται από εξεταζόμενη ουσία που περιέχει N, προσδιορίζεται η αύξηση στη συγκέντρωση νιτρωδών και νιτρικών σε διάστημα 28 ημερών και υπολογίζεται η διόρθωση για το οξυγόνο που καταναλώνεται με τη ντροποίηση (Παράρτημα V).

V.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

V.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

= mg O_2 ανά mg εξεταζόμενης ουσίας.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ uptake by test chemical} - \text{mg } O_2 \text{ uptake by blank})}{(\text{mg test chemical in flask})}$$

Η επί τοις εκατό βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται είτε από:

ή από:

$$\%\ \text{biodegradation} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg chemical})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ chemical})} \times 100$$

Η ανάλωση οξυγόνου (mg) της εξεταζόμενης ουσίας μετά από δεδομένο χρονικό διάστημα (διορθωμένη σε σχέση με την ανάλωση του τυφλού για το ίδιο χρονικό διάστημα) διαιρείται με το βάρος της χρησιμοποιούμενης εξεταζόμενης χημικής ουσίας. Το λαμβανόμενο αποτέλεσμα παρέχει το BOD εκφρασμένο σαν mg οξυγόνου/mg εξεταζόμενης ουσίας, δηλ.:

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg chemical})}{\text{COD}(\text{mg } O_2 \text{ chemical})} \times 100$$

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο αυτές μέθοδοι δεν δίνουν κατ' ανάγκη την ίδια τιμή· προτιμότερο είναι να χρησιμοποιείται η πρώτη μέθοδος.

Για τις εξερταζόμενες ουσίες που περιέχουν άζωτο, χρησιμοποιείται η κατάλληλη παράμετρος ThOD σύμφωνα με το τι είναι γνωστό ή τι αναμένεται όσον αφορά τη μεσολάβηση νιτροποίησης (Παράρτημα II.2). Εάν παρ' όλα αυτά, επέρχεται νιτροποίηση που δεν είναι όμως πλήρης, υπολογίζεται μία διορθωτική τιμή για το οξυγόνο που καταναλίσκεται για νιτροποίηση από τις αλλαγές στη συγκέντρωση των νιτρωδών και νιτρικών (Παράρτημα V).

Όταν εκτελούνται προαιρετικοί προσδιορισμοί οργανικού άνθρακα και/ή ειδικής χημικής ουσίας, η επί τοις εκατό αποικοδόμηση υπολογίζεται όπως περιγράφεται στο 1.7.

Όλα τα αποτελέσματα καταγράφονται στα φύλλα δεδομένων.

V.3.2. **Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων**

Η κατανάλωση οξυγόνου από το τυφλό του εμβολίου είναι κανονικά 20-30 mg O_2/l και δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 60 mg/l σε 28 ημέρες. Τιμές μεγαλύτερες από 60 mg/l απαιτούν επισταμένη εξέταση των δεδομένων και των πειραματικών τεχνικών. Εάν η τιμή του pH είναι έξω από τα όρια του 6-8,5 και η κατανάλωση οξυγόνου από την εξεταζόμενη ουσία είναι μικρότερη του 60 %, η δοκιμή θα πρέπει να επαναληφθεί με μικρότερη συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας.

Βλ. επίσης 1.5.2.

▼B

V.3.3. **Έκθεση**

Βλ. 1.8

V.4. **ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

ΔΟΚΙΜΗ ΜΑΝΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΙΟΜΕΤΡΙΑΣ

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l σαν ουσία

Αρχική συγκέντρωση στο ανόργανο μέσον, C_0: ... mg/l σαν ουσία

Όγκος στη φιάλη δοκιμής (V): ...

ThOD ή COD: ... mg O_2/mg ουσίας εξεταζόμενης (NH_4, $N0_3$)

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Πηγή: ...

Πραγματοποιηθείσα κατεργασία: ...

Προεγκλιματισμός, εφόσον υπήρξε: ...

Συγκέντρωση αιωρουμένων στερεών στο αντιδρόν μείγμα: ... mg/l

5. **ΑΝΑΛΩΣΗ ΟΞΥΓΟΝΟΥ: ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ**

		Χρόνος (ημέρες)											
		0		7		14			21			28	
O_2 αναλώμενο (mg) εξεταζόμενη ουσία	1												
	2												
	3, μέση												
O_2 αναλώμενο (mg) τυφλό	3												
	4												
	B, μέση												
Διορθωμένο BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD ανά mg εξεταζόμενης ουσίας	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Χρόνος (ημέρες)											
		0		7		14			21			28	
% αποικοδόμηση $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Μέση (*)												

V = όγκος μέσου στη φιάλη δοκιμής.
(*) Δεν πρέπει να εξάγεται μέσος όρος για το D_1 και D_2 αν υπάρχει αναμεσά τους σοβαρή διαφορά.

Σημείωση: παρόμοιες διατάξεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την ουσία αναφοράς και για τους ελέγχους τοξικότητας.

6. **ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΓΙΑ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ** (Βλέπε Παράρτημα V)

Ημέρα		0	28	Διαφορά
(i)	Συγκέντρωση νιτρικών (mg N/l)			(N)
(ii)	Ισοδύναμο οξυγόνο (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii)	Ισοδύναμο νιτρωδών (mg N/l)			(N)
(iv)	Ισοδύναμο οξυγόνο (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Ολικό ισοδύναμο οξυγόνο	—	—	

7. **ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΘΡΑΚΑ** (προαιρετική)

Αναλυτής άνθρακα: ...

Χρόνος (ημέρα)	Τυφλό mg/l	Εξεταζόμενη ουσία mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) ή στο τέλος της επώασης.

$$\% \text{ DOC} - \text{απομακαρυνθείς} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **ΕΙΔΙΚΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ** (προαιρετική)

S_b = συγκέντρωση σε φυσικοχημικό (στείρο) μάρτυρα στις 28 ημέρες.

S_a = συγκέντρωση σε εμβολιασμένη φιάλη στις 28 ημέρες

$$\% \text{ βιοαποικοδόμηση} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ** (προαιρετική)

α = κατανάλωση οξυγόνου σε στείρες φιάλες μετά από 28 ημέρες (mg)

$$\text{χατανάλωση οξυγόνου ανά mg εξεταζόμενης ουσίας} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(βλέπε τμήματα 1 και 3)

$$\% \text{ αβιοτική αποιχοδόμηση} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

ΜΕΡΟΣ VI. **ΔΟΚΙΜΗ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ** (Μέθοδος Γ. 4-Ε)

VI.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Το διάλυμα της εξεταζόμενης ουσίας σε ανόργανο μέσο, συνήθως 2-5 mg/l, εμβολιάζεται με σχετικά μικρό αριθμό μικροοργανισμών από μεικτό πληθυσμό και φυλάσσεται σε πλήρως γεμισμένες, κλειστές φιάλες στο σκοτάδι σε σταθερή θερμοκρασία. Η αποικοδόμηση παρακολουθείται με ανάλυση του διαλελυμένου οξυγόνου για χρονικό διάστημα 28 ημερών. Η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλίσκεται από την εξεταζόμενη ουσία, διορθωμένη κατά την ανάλωση του τυφλού που διενεργείται παράλληλα, εκφράζεται σαν το εκατοστιαίο ποσοστό του ThOD ή COD.

VI.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

VI.2.1. **Εξοπλισμός**

α) Φιάλες BOD, με γυάλινα πώματα, π.χ. 250-300 ml.

β) Υδρόλουτρο ή επωαστικός θάλαμος, για να διατηρούνται οι φιάλες σε σταθερή θερμοκρασία (± 1 °C ή και λιγότερο) μακρυά από το φως·

γ) Μεγάλες γυάλινες φιάλες (2-5 λίτρων) για την ετοιμασία των ανόργανων μέσων και για το γέμισμα των φιαλών BOD·

δ) Ηλεκτρόδιο και μετρητής οξυγόνου, ή όργανα και αντιδραστήρια για τιτλοδότηση Winkler.

VI.2.2. **Προετοιμασία του ανόργανου μέσου**

Για την ετοιμασία του αρχικού διαλύματος, βλ. 1.6.2.

Αναμειγνύεται 1 ml διαλύματος (α) έως (δ) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι το ένα λίτρο με νερό αραίωσης.

VI.2.3. **Ετοιμασία του εμβολίου**

Το εμβόλιο κανονικά παράγεται από δευτερογενή λύματα μονάδας κατεργασίας ή εργαστηριακής μονάδας που δέχεται κυρίως οικιακά λύματα. Εναλλακτική πηγή εμβολίου είναι τα επιφανειακά νερά. Χρησιμοποιούνται κανονικά μιά σταγόνα (0,05 ml) έως 5 ml διηθήματος ανά λίτρο μέσου. Πιθανόν να χρειασθούν δοκιμές για τον καθορισμό του καταλλήλου όγκου για δεδομένα λύματα, (βλέπε 1.6.4.2. και 1.6.5.)

VI.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Στο ανόργανο μέσο διαβιβάζεται για τουλάχιστον 20 λεπτά, ισχυρό ρεύμα αέρα. Κάθε σειρά δοκιμών πραγματοποιείται με ανόργανο μέσο που προέρχεται από την ίδια παρτίδα. Γενικά, το μέσο είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί αφού παραμείνει επί 20 ώρες στη θερμοκρασία δοκιμής. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου για να χρησιμεύσει σαν μάρτυρας. Η τιμή θα πρέπει να είναι περίπου 9 mg/l στους 20 °C. Όλες οι εργασίες μεταφοράς και γεμίσματος του κορεσμένου σε αέρα μέσου διεξάγονται χωρίς να υπάρχουν φυσαλλίδες, π· χ., χρησιμοποιώντας σιφώνια.

▼B

Ετοιμάζονται παράλληλες ομάδες φιαλών BOD για τον προσδιορισμό της εξεταζόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς σε ταυτόχρονες πειραματικές σειρές. Επαρκής αριθμός φιαλών BOD, συμπεριλαμβανομένων και φιαλών τυφλού, συνδυάζονται έτσι ώστε να μπορούν να γίνουν διπλές τουλάχιστον μετρήσεις κατανάλωσης οξυγόνου στις επιθυμητές χρονικές στιγμές, π.χ., μετά 0, 7, 14, 21 και 28 ημέρες. Για να εξασφαλισθεί η δυνατότητα αναγνώρισης του 10 ήμερου παραθύρου, μπορεί να απαιτηθούν περισσότερες φιάλες.

Ανόργανο μέσο που έχει υποστεί πλήρη αερισμό, φέρεται σε μεγάλες φιάλες έτσι ώστε αυτές να είναι γεμάτες περίπου κατά το ένα τρίτο. Προστίθεται κατόπιν επαρκής ποσότητα των αρχικών διαλυμάτων της εξεταζόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς σε ξεχωριστές μεγάλες φιάλες έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των ουσιών να μην είναι κανονικά μεγαλύτερη από 10 mg/l. Στο μέσο που θα παίξει ρόλο τυφλού και περιέχεται σε μία άλλη μεγάλη φιάλη, δεν προστίθεται καμία από τις ουσίες.

Προκειμένου να εξασφαλισθεί ο μη περιορισμός της δραστικότητας του εμβολίου, η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου δεν πρέπει να πέφτει κάτω από τα 0,5 mg/l στις φιάλες BOD. Αυτό περιορίζει τη συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας σε 2 mg/l περίπου. Παρ' όλα αυτά, για ασθενώς αποικοδομήσιμες ενώσεις και για ενώσεις με χαμηλό ThOD, μπορούν να χρησιμοποιηθούν 5-10 mg/l. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι επιθυμητό να ετοιμασθούν παράλληλες σειρές εξεταζόμενης ουσίας με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, για παράδειγμα, 2 και 5 mg/l. Κανονικά, το ThOD υπολογίζεται με βάση τον σχηματισμό αμμωνιακών αλάτων αλλά, αν αναμένεται ή είναι γνωστό ότι επήλθε νιτροποίηση, υπολογίζεται με βάση τον σχηματισμό νιτρικών ($ThOD_{N03}$: βλέπε Παράρτημα II.2). Παρ' όλα αυτά, αν επέρχεται νιτροποίηση χωρίς να είναι πλήρης, γίνονται διορθώσεις με βάση τις αλλαγές στη συγκέντρωση νιτρωδών και νιτρικών, που προσδιορίζεται με ανάλυση (βλέπε Παράρτημα V).

Εάν πρέπει να διερευνηθεί η τοξικότητα της εξεταζόμενης ουσίας (στην περίπτωση, για παράδειγμα, που έχει βρεθεί προηγούμενα χαμηλή τιμή βιοαποικοδομησιμότητας), χρειάζεται μία άλλη σειρά φιαλών.

Ετοιμάζεται μια άλλη μεγάλη φιάλη που περιέχει ανόργανο μέσον που έχει υποβληθεί σε εμφύσηση αέρα (στο ένα τρίτο περίπου του όγκου της) μαζί με εξεταζόμενη ουσία και ουσία αναφοράς. Οι τελικές συγκεντρώσεις είναι κανονικά οι ίδιες με τις συγκεντρώσεις στις άλλες μεγάλες φιάλες.

Τα διαλύματα στις μεγάλες φιάλες εμβολιάζονται με δευτερογενή λύματα (μία σταγόνα ή περίπου 0,05 ml, έως 5 ml/l) ή με μία άλλη πηγή όπως ποταμίσιο νερό (βλ. 1.6.4.2.). Τελικά, τα διαλύματα συμπληρώνονται μέχρι τον όγκο της φιάλης με ανόργανο μέσον που υποβλήθηκε σε εμφύσηση αέρα, χρησιμοποιώντας ένα σωλήνα που φθάνει μέχρι τον πυθμένα της φιάλης για να επιτυγχάνεται η κατάλληλη ανάμειξη.

VI.2.5. **Αριθμός φιαλών σε μία τυπική διαδικασία δοκιμής**

Σε μία τυπική διαδικασία, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες φιάλες:

— τουλάχιστον 10 που περιέχουν εξεταζόμενη ουσία και εμβόλιο (εναιώρημα ουσίας δοκιμής),

— τουλάχιστον 10 που περιέχουν μόνον εμβόλιο (τυφλό εμβολίου),

— τουλάχιστον 10 που περιέχουν ουσία αναφοράς και εμβόλιο (έλεγχος διαδικασίας),

▼B

— και, όταν χρειάζεται, 6 φιάλες που περιέχουν εξεταζόμενη ουσία, ουσία αναφοράς και εμβόλιο (έλεγχος τοξικότητας). Παρ' όλα αυτά, για να εξασφαλισθεί η δυνατότητα αναγνώρισης του 10 ήμερου παραθύρου, μπορεί να χρειασθούν οι διπλάσιες από αυτές φιάλες.

VI.2.6. Εκτέλεση της δοκιμής

Κάθε διάλυμα που παρασκευάζεται φέρεται αμέσως στην αντίστοιχη ομάδα φιαλών BOD με σωλήνα που ξεκινά από το κατώτερο τέταρτο (όχι από τον πυθμένα) της κατάλληλης μεγάλης φιάλης, έτσι ώστε να γεμισθούν τελείως όλες οι φιάλες BOD. Οι φιάλες κτυπιώνται ελαφρά ώστε να απομακρυνθεί οποιαδήποτε φυσαλλίδα αέρα. Οι φιάλες που αντιστοιχούν στο χρόνο μηδέν υποβάλλονται σε ανάλυση αμέσως για τον προσδιορισμό διαλελυμένου οξυγόνου με την μέθοδο Winkler ή τη μέθοδο των ηλεκτροδίων. Το περιεχόμενο των φιαλών μπορεί να διατηρηθεί για μετέπειτα ανάλυση με τη μέθοδο Winkler προσθέτοντας θειικό μαγγάνιο (II) και υδροξείδιο του νατρίου (το πρώτο αντιδραστήριο του Winkler). Οι πωματισμένες με προσοχή φιάλες που περιέχουν το οξυγόνο που έχει δεσμευθεί με την μορφή καφέ ένυδρου οξειδίου του μαγγανίου (III), φυλάσσονται στο σκοτάδι στους 10-20 ^{o}C για 24 το πολύ ώρες πριν υποβληθούν στα επόμενα στάδια της μεθόδου Winkler. Οι παραμένουσες ίδιες φιάλες πωματίζονται ώστε να εξασφαλισθεί ότι δεν θα εμπερικλείονται φυσσαλίδες αέρα και επωάζονται στους 20 ^{o}C στο σκοτάδι. Κάθε σειρά πρέπει να συνοδεύεται από μία πλήρη παράλληλη σειρά για τον προσδιορισμό του εμβολιασμένου τυφλού. Κατά την διάρκεια των 28 ημερών επώασης, λαμβάνονται τουλάχιστον διπλές φιάλες από όλες τις σειρές για ανάλυση διαλελυμένου οξυγόνου σε ορισμένα χρονικά διαστήματα (τουλάχιστον μιά φορά την εβδομάδα).

Με τα εβδομαδιαία δείγματα θα πρέπει να μπορεί να γίνεται εκτίμηση της επί τοις εκατό απομάκρυνσης σε 14ήμερο παράθυρο, ενώ με τη δειγματοληψία κάθε 3-4 ημέρες θα πρέπει να μπορεί να αναγνωρίζεται το 10 ήμερο παράθυρο, πράγμα που απαιτεί τις διπλάσιες περίπου φιάλες.

Σε εξεταζόμενες ουσίες που περιέχουν άζωτο, θα πρέπει να γίνονται διορθώσεις για να λαμβάνεται υπόφη η ανάλωση οξυγόνου από τυχόν επερχόμενη νιτροποίηση. Για να γίνει αυτό, χρησιμοποιείται η μέθοδος του ηλεκτροδίου οξυγόνου για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του διαλελυμένου οξυγόνου και κατόπιν λαμβάνεται δείγμα από τη φιάλη BOD για ανάλυση των νιτρωδών και νιτρικών. Από την αύξηση της συγκέντρωσης νιτρωδών και νιτρικών, υπολογίζεται το χρησιμοποιηθέν οξυγόνο (βλ. Παράρτημα V).

VI.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

VI.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Υπολογίζεται πρώτα το BOD για κάθε χρονική περίοδο αφαιρώντας την ελάττωση του οξυγόνου (mg O_2/l) του τυφλού από αυτή που εμφανίζει η εξεταζόμενη ουσία. Η διορθωμένη αυτή ελάττωση διαιρείται με τη συγκέντρωση (mg/l) της εξεταζόμενης ουσίας για να ληφθεί το ειδικό BOD σαν mg οξυγόνου ανά mg εξεταζόμενης ουσίας. Η επί τοις εκατό βιοαποικοδομησιμότητα υπολογίζεται διαιρώντας το ειδικό BOD με το ειδικό ThOD (που υπολογίζεται σύμφωνα με το Παράρτημα II.2) ή COD (που προσδιορίζεται με ανάλυση, βλέπε Παράρτημα 11.3), κατά συνέπεια:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ αναλωμένου απο την εξεταζόμενη ουσία} - \text{mg } O_2 \text{ αναλωμένου από τυφλό})}{(\text{mg εξεταζόμενης ουσίας στη φιάλη})}$$

▼B

= mg O_2 ανά mg εξεταζόμενης ουσίας

$$\% \text{ αποιχοδόμηση} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg εξεταζόμενης ουσίας)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg εξεταζόμενης ουσίας)}} \times 100$$

ή

$$\% \text{ αποιχοδόμηση} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg εξεταζόμενης ουσίας)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg εξεταζόμενης ουσίας)}} \times 100$$

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο αυτές μέθοδοι δεν δίνουν κατ9 ανάγκη την ίδια τιμή. Προτιμότερο είναι να χρησιμοποιείται η πρώτη μέθοδος.

Στην περίπτωση ουσιών που περιέχουν άζωτο, χρησιμοποείται η κατάλληλη παράμετρος ThOD (NH_4 ή $N0_3$) ανάλογα με το αν αναμένεται ή είναι γνωστό ότι συμβαίνει νιτροποίηση (Παράρτημα Π.2), Εάν συμβαίνει νιτροποίηση χωρίζ όμως να είναι πλήρης, υπολογίζεται μία διόρθωση για το οξυγόνο που καταναλίσκεται εξαιτίας της νατροποίησης λαμβάνοντας υπόψη τις αλλαγές στη συγκέντρωση των νιτρωδών και νιτρικών (Παράρτημα V).

VI.3.2. **Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων**

Η ελάττωση οξυγόνου στο τυφλό δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1,5 mg διαλελυμένου οξυγόνου/1 μετά από 28 ημέρες. Σε περίπτωση τιμών που είναι μεγαλύτερες από αυτή, απαιτείται η διερεύνηση των πειραματικών τεχνικών. Η εναπομένουσα συγκέντρωση οξυγόνου στις φιάλες της δοκιμής δεν πρέπει να πέφτει κάτω από τα 0,5 mg/l σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή. Τέτοια χαμηλά επίπεδα οξυγόνου είναι έγκυρα μόνον αν η μέθοδος προσδιορισμού διαλελυμένου οξυγόνου η οποία χρησιμοποιείται, είναι δυνατό να μετρήσει με ορθότητα τέτοια επίπεδα.

Βλέπε επίσης 1.5.2.

VI.3.3. **Έκθεση**

Βλ. 1.8.

VI.4. ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l

Αρχική συγκέντρωση στη φιάλη: ... mg/l

ΤηΟΔ ή COD: ... mg O_2/mg εξεταζόμενης ουσίας

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Πηγή. ...

Πραγματοποιηθείσα κατεργασία:…

▼B

Προεγκλιματισμός, εφόσον υπήρξε:…

Συγκέντρωση στο αντιδρόν μείγμα: ... ml/l

5. **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DO**

Μέθοδος: Winkler/*ηλεκτρόδιο*

Αναλύσεις φιαλών

Χρόνος Επώασης (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Τυφλό (χωρις χημική ουσία)	1	C_1				
	2	C_2				
Μέσο	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Εξεταζόμενη ουσία	1	a_1				
	2	a_2				
Μέσο	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Σημείωση: Ίδιος τύπος δεδομένων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ουσία αναφαράς και τον έλεγχο τοξικοτητας.

6. **ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ** (Βλέπε Παράρτημα V)

Χρόνος επώασης (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Συγκέντρωση νιτρικών (mg N/l)				
(ii)	Αλλαγή στη συγκέντρωση νιτρικών (mg N/l)	—			
(iii)	Ισοδύναμο οξυγόνου (mg/l)	—			
(iv)	Συγκέντρωση νιτρωδών (mg N/l)				
(v)	Αλλαγή στη συγκέντρωση νιτρωδών (mg N/l)	—			
(vi)	Ισοδύναμο οξυγόνου (mg/l)	—			
(iii + vi)	Ολικό ισοδύναμο οξυγόνου (mg/l)	—			

7. **ΕΛΑΤΤΩΣΗ DO: % ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ**

	Ελάτωση μετά από η ημέρες (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
ΦΙΑΛΗ 1: $(m_{to} - m_{tx}) - m_{bo} - m_{bx})$				
ΦΙΑΛΗ 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Ελάτωση μετά από η ημέρες (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
ΦΙΑΛΗ 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{συφκεν. δοκιμής} \times \text{ThOD ουσίας}}$				
ΦΙΑΛΗ 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{συφκεν. δοκιμης} \times \text{ThOD ουσίας}}$				
$\% D \text{ μέσο } (*) = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Δεν πρέπει να εξάγεται μέσος όρος αν υπάρχουν σοβαρές διαφορές οτις επαναλήψεις.

m_{t0} = τιμή στη φιάλη δοκιμής στο χρόνο 0

m_{tx} = τιμή στη φιάλη δοκιμής στο χρόνο x

m_{bo} = μέση τιμή τυφλού σε χρόνο 0

m_{bx} = μέση τιμή τυφλού σε χρόνο x

Η διόρθωση για τη νιτροποίηση από iii + vi εφαρμόζεται επίσης και στο τμήμα 6.

8. **ΕΛΑΤΤΩΣΕΙΣ DO ΣΤΟ ΤΥΦΛΟ**

Κατανάλωση οξυγόνου στο τυφλό: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Η κατανάλωση αυτή είναι σημαντική για την εγκυρότητα της δοκιμής. Θα πρέπει να είναι μικρότερη από 1,5 mg/l.

ΜΕΡΟΣ VII. **ΔΟΚΙΜΗ Μ.Ι.Τ.Ι** (Μέθοδος Γ.4-Ζ)

VII.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σε σκοτεινό, κλεισμένο αναπνευσιόμετρο και σε θερμοκρασία 25 ± 1 ºC, μετριέται αυτόματα για μία περίοδο 28 ημερών η ανάλωση οξυγόνου από αναδευόμενο διάλυμα, ή εναιώρημα, της εξεταζόμενης ουσίας σε ανόργανο μέσο, εμβολιασμένο με ειδικά ανεπτυγμένους, μη προσαρμοσμένους μικροοργανισμούς. Το εκλυόμενο διοξείδιο του άνθρακα προσροφάται σε νατράσβεστο. Η βιοαποικοδομησιμότητα εκφράζεται σαν η επί τοις εκατό ανάλωση οξυγόνου (διορθωμένη κατά την ανάλωση του τυφλού) της θεωρητικής ανάλωσης (ThOD). Το εκατοστιαίο ποσοστό πρωταρχικής βιοαποικοδομησιμότητας υπολογίζεται επίσης με συμπληρωματική ειδική χημική ανάλυση που γίνεται στην αρχή και στο τέλος της επώασης και, ενδεχομένως, με ανάλυση DOC.

VII.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

VII.2.1. **Εξοπλισμός**

α) Αυτόματος ηλεκτρολυτικός μετρητής BOD ή αναπνευσιόμετρο που φέρει κανονικά 6 φιάλες, των 300 ml η καθεμία, και δοχεία που περιέχουν υλικό προσρόφησης CO_2·

▼B

β) Σταθερή θερμοκρασία δωματίου και/ή υδρόλουτρο στους 25 ± 1 °C ή και καλύτερο·

γ) Διάταξη διήθησης με μεμβράνη (προαιρετική)·

δ) Αναλυτής άνθρακα (προαιρετικός).

VII.2.2. **Προετοιμασία του ανόργανου μέσου**

Παρασκευάζονται τα ακόλουθα αρχικά διαλύματα, χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας και νερό (I.6.1):

(α)	Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2P0_4	8,50 g
	Μονόξινο φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4	21,75 g
	Δωδεκάυδρο μονόξινο φωσφορικό νάτριο, Na_2HPO_4 . 12 H_2O.	44,60 g
	Χλωριούχο αμμώνιο, NH_4Cl	1,70 g
	Διαλύεται σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο.	
	Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 7,2	
(β)	Επτάυδρο θειικό μαγνήσιο, $MgS0_4.7\ H_20$	22,50 g
	Διαλύεται σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο	
(γ)	νυδρο χλωριούχο ασβέστιο, $CaCl_2$	27,50 g
	Διαλύεται σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο	
(δ)	Εξάνυδρος τριχλωριούχος σίδηρος, $FeCl_3.6\ H_2O$	0,25 g
	Διαλύεται σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο.	

Λαμβάνονται 3 ml από κάθε διάλυμα (α), (β), (γ) και (δ) και συμπληρώνονται μέχρι 1 λίτρο.

VII.2.3. **Παρασκευή του εμβολίου**

Συλλέγονται πρόσφατα δείγματα από δέκα τουλάχιστον σημεία, κυρίως από περιοχές όπου χρησιμοποιούνται και απορρίπτονται πολλών ειδών χημικά. Από σημεία όπως εγκαταστάσεις κατεργασίας λυμάτων αποχετεύσεων, κατεργασίας βιομηχανικών αποβλήτων, ποταμούς, λίμνες, θάλασσες, λαμβάνονται δείγματα λάσπης, επιφανειακού εδάφους, νερού, κ.λπ., όγκου 1 λίτρου, και αναμειγνύονται καλά. Αφού απομακρυνθεί το υλικό που επιπλέει και το υπόλοιπο αφεθεί να κατακαθίσει, ρυθμίζεται το pH του υπερκείμενου υγρού στο 7 ± 1 με υδροξείδιο του νατρίου ή φωσφορικό οξύ.

Λαμβάνεται κατάλληλος όγκος διηθημένου υπερκείμενου υγρού και χρησιμοποιείται για την πλήρωση δοχείου ενεργοποιημένης λάσπης. Στο υγρό εμφυσάται αέρας για χρονικό διάστημα περίπου 23,5 ωρών. Τριάντα λεπτά αφού σταματήσει η εμφύσηση αέρα, το ένα τρίτο περίπου του ολικού όγκου του υπερκειμένου απορρίπτεται και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος (pH 7) που περιέχει γλυκόζη, πεπτόνη και δισόξινο φωσφορικό κάλιο σε ποσοστό 0,1 % το καθένα, στο υλικό που έχει παραμείνει και ξαναρχίζει η διαβίβαση αέρα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μία φορά την ημέρα. Η μονάδα πρέπει να λειτουργεί σύμφωνα με τους κανόνες ορθής πρακτικής: τα λύματα πρέπει να είναι διαυγή, η θερμοκρασία να κρατείται στούς 25 ± 2 °C, το pH 7 ± 1, να γίνεται καλή κατακάθιση της λάσπης, επαρκής αερισμός ώστε να διατηρείται το μείγμα συνεχώς αερόβιο, να υπάρχουν πρωτόζωα και να εξετάζεται η δραστικότητα της λάσπης με βάση την ουσία αναφοράς κάθε τρεις τουλάχιστον μήνες. Λάσπη δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σαν εμβόλιο παρά μόνο μετά από ένα τουλάχιστον μήνα διεργασία, όχι όμως αργότερα από τέσσερις μήνες. Συνεπώς, η δειγματοληψία πρέπει να γίνεται από 10 τουλάχιστον σημεία σε τακτά χρονικά διαστήματα, μία φορά κάθε τρεις μήνες.

▼B

Για να διατηρείται η πρόσφατη και η παλιά λάσπη στην ίδια δραστικότητα, το διηθημένο υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιούμενης ενεργοποιημένης λάσπης αναμειγνύεται με ίσο όγκο του διηθημένου υπερκείμενου υγρού πρόσφατα συλλεγέντος μείγματος από δέκα πηγές και το υγρό που προκύπτει από τη συνένωση καλλιεργείται όπως πιο πάνω. Μπορεί να παραληφθεί λάσπη για να χρησιμοποιηθεί σαν εμβόλιο, 18-24 ώρες μετά την τροφοδοσία της μονάδας.

VII.2.4. **Προετοιμασία των φιαλών**

Ετοιμάζονται οι ακόλουθες έξι φιάλες:

No. 1: εξεταζόμενη ουσία σε νερό αραίωσης με συγκέντρωση 100 mg/l.

No. 2, 3 και 4: εξεταζόμενη ουσία σε ανόργανο μέσο με συγκέντρωση 100 mg/l.

No. 5: ουσία αναφοράς (π.χ. ανιλίνη) σε ανόργανο μέσο με συγκέντρωση 100 mg/l.

No. 6: μόνον ανόργανο μέσο.

Οι ασθενώς διαλυτές εξεταζόμενες ουσίες προστίθενται απ' ευθείας με βάση το βάρος ή τον όγκο ή ακολουθείται η διαδικασία του Παραρτήματος III, εκτός από το ότι δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί ούτε διαλύτης ούτε γαλακτωματοποιητής. Το υλικό προσρόφησης του CO, προστίθεται σε όλες τις φιάλες στα ειδικά διατιθέμενα δοχεία. Το pH στις φιάλες 2, 3 και 4 ρυθμίζεται στο 7,0.

VII.2.5. **Εκτέλεση της δοκιμής**

Οι φιάλες 2, 3 και 4 (εναιωρήματα εξεταζόμενης ουσίας), 5 (έλεγχος δραστικότητας) και 6 (τυφλό) εμβολιάζονται με μικρή ποσότητα εμβολίου ώστε να ληφθεί συγκέντρωση 30 mg/l εναιωρούμενων στερεών. Στη φιάλη 1 που χρησιμεύει για τον αβιοτικό έλεγχο δεν προστίθεται καθόλου εμβόλιο. Η διάταξη συναρμολογείται, ελέγχεται σε σχέση με το αν είναι αεροστεγής, τίθενται σε λειτουργία οι αναδευτήρες και αρχίζει η μέτρηση της ανάλωσης οξυγόνου σε συνθήκες σκότους. Ελέγχεται καθημερινά η θερμοκρασία, ο αναδευτήρας και ο κυλομετρικός καταγραφέας ανάλωσης οξυγόνου, σημειώνεται δε κάθε αλλαγή στο χρώμα του περιεχομένου των φιαλών. Οι αναλώσεις οξυγόνου από τις έξι φιάλες διαβάζονται απευθείας με μιά κατάλληλη μέθοδο, για παράδειγμα, από το διάγραμμα καταγραφέα εξαπλής καταγραφής, ο οποίος παρέχει την καμπύλη BOD. Στο τέλος της επώασης, 28 ημέρες κανονικά, μετριέται το pH του περιεχομένου των φιαλών και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της εναπομείνασας εξεταζόμενης ουσίας και κάθε ενδιάμεσου προϊόντος και, στην περίπτωση υδαταδιαλυτής ουσίας, η συγκέντρωση DOC (Παράρτημα II.4). Ιδιαίτερη μέριμνα λαμβάνεται στην περίπτωση πτητικών ουσιών. Εάν προβλέπεται νιτροποίηση, προσδιορίζεται αν είναι δυνατό, η συγκέντρωση νιτρικών και νιτρωδών.

VII.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

VII.3.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Η ανάλωση οξυγόνου (mg) μετά από ορισμένο χρόνο, διορθωμένη κατά την ανάλωση του τυφλού για τον ίδιο χρόνο, διαιρείται με το χρησιμοποιούμενο βάρος της εξεταζόμενης ουσίας. Έτσι λαμβάνεται το BOD εκφρασμένο ως mg οξυγόνου/mg εξεταζόμενης ουσίας, δηλαδή:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ αναλισχόμενα από εξεταζόμ.} - \text{mg } O_2 \text{ ουσία})}{(\text{mg εξεταζόμενης ουσίας στη φιάλη})}$$

= mg O_2 εξεταζόμενης ουσίας

▼B

Η επί της εκατό βιοαποικοδόμηση λαμβάνεται από τον τύπο:

$$\%\ \text{βιοαποιχοδόμηση} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg ουσίας)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg ουσίας)}} \times 100$$

Στην περίπτωση μειγμάτων, το ThOD υπολογίζεται από τη στοιχειακή ανάλυση, όπως για μία απλή ένωση. Ανάλογα με το αν δεν επέρχεται ή επέρχεται πλήρης νιτροποίηση (Παράρτημα II.2), χρησιμοποιείται η κατάλληλη παράμετρος ThOD ($ThOD_{NH4}$ ή $ThOD_{N03}$). Εάν παρ' όλα αυτά επέρχεται νιτροποίηση χωρίς όμως να είναι πλήρης, γίνεται μία διόρθωση για το οξυγόνο που καταναλίσκεται με τη νιτροποίηση που υπολογίζεται από τις αλλαγές στη συγκέντρωση νιτρωδών και νιτρικών (Παράρτημα V).

Η επί της εκατό πρωταρχική βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται από την απώλεια ειδικής (μητρικής) ουσίας (βλ. 1.7.2.).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Εάν υπάρχει απώλεια εξεταζόμενης ουσίας στη φιάλη 1 όπου μετριέται η φυσικοχημική απομάκρυνση, αυτό αναφέρεται στην έκθεση και η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας (S_b) μετά από 28 ημέρες στη φιάλη αυτή, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της επί της εκατό βιοαποικοδόμησης.

Όταν εκτελούνται προσδιορισμοί DOC (προαιρετικό), η επί τοις εκατό τελική βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται με τον τύπο:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

όπως περιγράφεται στο 1.7.1. Εάν υπάρχει απώλεια DOC στη φιάλη 1, στην οποία μετριέται η φυσικοχημική απομάκρυνση, η συγκέντρωση DOC στη φιάλη αυτή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της επί τοις εκατό βιοαποικοδόμησης.

Όλα τα αποτελέσματα καταγράφονται στα φύλλα δεδομένων.

VII.3.2. **Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων**

Η ανάλωση οξυγόνου από το τυφλό είναι κανονικά 20-30 mg O_2/l και δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 60 mg/l σε 28 ημέρες. Στην περίπτωση τιμών μεγαλύτερων από 60 mg/l, απαιτείται να πραγματοποιηθεί κριτική εξέταση των δεδομένων και των πειραματικών τεχνικών. Εάν το pH είναι έξω από τα όρια 6-8,5 και η κατανάλωση οξυγόνου από την εξεταζόμενη ουσία είναι μικρότερη από το 60 %, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με μικρότερη συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας.

Βλέπε επίσης 1.5.2.

Εάν η επί τοις εκατόν αποικοδόμηση της ανιλίνης υπολογιζόμενη από την κατανάλωση οξυγόνου δεν υπερβαίνει το 40 % μετά από 7 ημέρες και το 65 % μετά από 14 ημέρες, η δοκιμή θεωρείται σαν μη έγκυρη.

VII.3.3. **Έκθεση**

Βλ. 1.8.

VII.4. ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Ένα παράδειγμα φύλλου δεδομένων δίνεται παρακάτω.

ΔΟΚΙΜΗ ΜΙΤΙ (Ι)

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ**

▼B

3. **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ**

Όνομα:

Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος: ... mg/l σαν ουσία

Αρχική συγκέντρωση στο μέσον, C_0: ... mg/l σαν ουσία

Όγκος του μείγματος αντίδρασης, V: ... ml

ThOD: ... mg O_2/l

4. **ΕΜΒΟΛΙΟ**

Σημεία δειγματοληψίας λάσπης:

1) … 6) …

2) … 7) …

3) … 8) …

4) … 9) …

5) … 10) …

Συγκέντρωση εναιωρούμενων στερεών σε ενεργοποιημένη λάσπη μετά από εγκλιματισμό με συνθετικά λύματα = ... mg/l

Όγκος ενεργοποιημένης λάσπης ανά λίτρο τελικού μέσου = ...ml

Συγκέντρωση λάσπης στο τελικό μέσο = ...mg/l

5. **ΑΝΑΛΩΣΗ ΟΞΥΓΟΝΟΥ: ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ**

Τύπος χρησιμοποιημένου αναπνευσιομέτρου: ....

			Χρόνος (ημέρες)				
			0	7	14	21	28
Αναλώμενο O_2 (mg) εξεταζόμενη ουσία	a_1						
	a_2						
	a_3						
Αναλώμενο O_2 (mg) τυφλό	b						
Διορθωμένο αναλώμενο O_2 (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
BOD ανά εξεταζόμενης ουσίας	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Φιάλη 1					
		Φιάλη 2					
		Φιάλη 3					
% αποικοδόμηση $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		μέσο (*)					

(*) Δεν πρέπει να εξάγεται μέσος όρος αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επαναλήψεων.

▼B

Σημείωση: παρόμοιος τύπος δεδομένων μπορεί να χρηαιμοποιηθεί για την ουσία αναφοράς.

6. **ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΘΡΑΚΑ** (προαιρετική)

Αναλυτής άνθρακα: ...

Φιάλη	DOC				% DOC απομακρυνθείς	Μέσο
	Μετρούμενο		Διορθωμένο			
Νερό + εξεταζόμενη ουσία	a				—	—
Λάσπη + εξεταζόμενη ουσία	b_1		b_1 - c			
Λάσπη + εξεταζόμενη ουσία	b_2		b_2 - c			
Λάσπη + εξεταζόμενη ουσία	b_3		b_3 - c			
Μάρτυρας τυφλού	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC} - \text{απομακαρυνθείς} : \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **ΕΙΔΙΚΑ ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

	Εναπομένουσα ποσότητα εξεταζόμενης ουσίας στο τέλος της δοκιμής	% αποικοδόμηση
τυφλό δοκιμής με νερό	Sb	
εμβολιασμένο μέσον	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ απακοδόμηση} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Υπολογίζεται η % αποικοδόμηση για τις φιάλες a_1 a_2 και a_3 αντίστοιχα.

8. **ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

Πρέπει να επισυνάπτεται, αν υπάρχει, καμπύλη BOD σαν συνάρτηση του χρόνου.

▼B

Παραρτημα I

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

DO: Διαλελυμένο οξυγόνο (mg/l) είναι η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου σε ένα υδατικό δείγμα.

BOD: Βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (g) είναι η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται από μικροοργανισμούς κατά το μεταβολισμό μιας εξεταζόμενης ουσίας· εκφράζεται επίσης και σαν g ανάλωσης οξυγόνου ανά g εξεταζόμενης ουσίας, (βλέπε μέθοδο Γ.5.)

COD: Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (g) είναι η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται κατά την οξείδωση μιας εξεταζόμενης ουσίας εν θερμώ με όξινο διχρωμικό άλας· αποτελεί μέτρο της ποσότητας του υπάρχοντος οξειδώσιμου υλικού εκφράζεται επίσης και σαν g οξυγόνου καταναλισκόμενα ανά g εξεταζόμενης ένωσης, (βλέπε μέθοδο Γ.6.)

DOC: Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας είναι ο οργανικός άνθρακας που υπάρχει σε διάλυμα ή ο άνθρακας που διέρχεται διαμέσου φίλτρου 0,45 μικρομέτρων ή ο άνθρακας που παραμένει στο υπερκείμενο υγρό μετά από φυγοκέντρηση με 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) επί 15 λεπτά.

ThOD: Θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο (mg) είναι η ολική ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για να οξειδωθεί πλήρως μία χημική ουσία· υπολογίζεται από τον μοριακό τύπο (βλέπε Παράρτημα II.2) και εκφράζεται επίσης σαν mg οξυγόνου απαιτούμενου ανά mg εξεταζόμενης ένωσης.

$ThCO_2$: Θεωρητικό διοξείδιο του άνθρακα (mg) είναι η ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα που υπολογίζεται ότι παράγεται από τη γνωστή ή μετρούμενη ποσότητα άνθρακα της εξεταζόμενης ουσίας όταν μετατρέπεται πλήρως σε ανόργανη μορφή· εκφράζεται επίσης σαν mg διοξειδίου του άνθρακα που εκλύονται ανά mg εξεταζόμενης ουσίας.

TOC: Ολικός οργανικός άνθρακας ενός δείγματος είναι το άθροισμα του ευρισκόμενου υπό μορφή διαλύματος και εναιωρήματος οργανικού άνθρακα.

IC: Ανόργανος άνθρακας.

TC: Ολικός άνθρακας είναι το άθροισμα του οργανικού και ανόργανου άνθρακα που υπάρχει σε ένα δείγμα.

Πρωταρχική αποικοδόμηση:

είναι η μεταβολή στη χημική δομή μιας ουσίας που προέρχεται από βιολογική δράση και έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια χαρακτηριστικών ιδιοτήτων της ουσίας αυτής.

Τελική βιοαποικοδόμηση (αερόβια):

είναι ο βαθμός αποικοδόμησης που επιτυγχάνεται όταν η εξεταζόμενη ένωση καταναλίσκεται καθ· ολοκληρία από μικροοργανισμούς καταλήγοντας στην παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, νερού, ανόργανων αλάτων και νέων μικροβιακών κυτταρικών συστατικών (βιομάζα).

Ευκόλως βιοαποικοδομήσιμη:

αυθαίρετη κατάταξη χημικών ουσιών που έχουν περάσει ορισμένες συγκεκριμένες επιλεκτικές δοκιμές τελικής βιοαποικοδομησιμότητας· οι δοκιμές αυτές είναι τόσο περιοριστικές που να εκτιμάται ότι οι ενώσεις αυτές βιοαποικοδομούνται ταχέως και πλήρως σε υδατικό περιβάλλον κάτω από αερόβιες συνθήκες.

▼B

Εγγενώς βιοαποικοδομήσιμη:

κατάταξη χημικών ουσιών για τις οποίες υπάρχουν αναμφίβολες αποδείξεις βιοαποικοδόμησης (πρωταρχική ή τελική) σε οποιαδήποτε αναγνωρισμένη δοκιμή βιοαποικοδόμησης.

Κατεργασιμότητα:

ο όρος χαρακτηρίζει την ευκολία με την οποία μια ένωση μπορεί να απομακρυνθεί κατά την βιολογική κατεργασία λυμάτων χωρίς να επηρεασθεί δυσμενώς η κανονική λειτουργία των μεθόδων κατεργασίας. Γενικά, οι ευκόλως βιοαποικοδομήσιμες ενώσεις είναι κατεργάσιμες όχι όμως και όλες οι εγγενώς βιοαποικοδομήσιμες ενώσεις. Μπορεί επίσης να λάβουν χώρα και αβιοτικές διεργασίες.

Χρόνος υστέρησης

είναι ο χρόνος που μεσολαβεί από τον εμβολιασμό, σε μια δοκιμή ελάττωσης, μέχρι τη χρονική στιγμή που το ποσοστό αποικοδόμησης αυξάνεται στο 10 % τουλάχιστον. Ο χρόνος υστέρησης παρουσιάζει συχνά μεγάλες διακυμάνσεις και μικρή αναπαραγωγιμότητα.

Χρόνος αποικοδόμησης

είναι ο χρόνος που μεσολαβεί από τη λήξη του χρόνου υστέρησης μέχρι τη χρονική στηγμή κατά την οποία επιτυγχάνεται το 90 % του μέγιστου βαθμού αποικοδόμησης.

10 ήμερο παράθυρο

είναι οι δέκα ημέρες που ακολουθούν αμέσως μετά την επίτευξη αποικοδόμησης 10 %.

▼B

Παραρτημα II

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Ανάλογα με την επιλεγόμενη μέθοδο απαιτούνται και ορισμένες μοριακές παράμετροι. Στα επόμενα περιγράφεται η εξαγωγή των τιμών αυτών. Η χρήση των παραμέτρων αυτών περιγράφεται στις συγκεκριμένες μεθόδους.

1. **Περιεκτικότητα σε άνθρακα**

Η περιεκτικότητα σε άνθρακα υπολογίζεται από τη γνωστή στοιχειακή σύσταση ή προσδιορίζεται με στοιχειακή ανάλυση της εξεταζόμενης ουσίας.

2. **Θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD)**

Το θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD) μπορεί να υπολογισθεί αν η στοιχειακή σύσταση είναι γνωστή ή προσδιορισθεί με στοιχειακή ανάλυση. Για την ένωση:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}0_0P_pS_s$

χωρίς νιτροποίηση,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

ή με νιτροποίηση,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD)**

Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD) προσδιορίζεται με τη μέθοδο Γ.6.

4. **Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας (DOC)**

Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) είναι εξ ορισμού ο οργανικός άνθρακας κάθε χημικής ουσίας ή μείγματος σε νερό που διέρχεται διαμέσου φίλτρου 0,45 μικρομέτρων.

Λαμβάνονται δείγματα από τις δοκιμαστικές φιάλες και διηθούνται αμέσως στη διηθητική συσκευή χρησιμοποιώντας την κατάλληλη διηθητική μεμβράνη. Τα πρώτα 20 ml (η ποσότητα αυτή μπορεί να ελαττωθεί όταν χρησιμοποιούνται μικρά φίλτρα) του διηθήματος απορρίπτονται. Για την ανάλυση του άνθρακα χρησιμοποιούνται όγκοι 10-20 ml ή και μικρότεροι για περίπτωση ένεσης (ο όγκος εξαρτάται από την ποσότητα που απαιτείται για τον αναλυτή άνθρακα). Η συγκέντρωση του DOC προσδιορίζεται με αναλυτή οργανικού άνθρακα, που μπορεί να κάνει ακριβείς μετρήσεις για συγκεντρώσεις άνθρακα ίσες ή και μικρότερες του 10 % της αρχικής συγκέντρωσης DOC που χρησιμοποιείται στη δοκιμή.

Τα διηθημένα δείγματα που δεν μπορούν να αναλυθούν την ίδια ημέρα μπορούν να φυλάσσονται σε ψυγείο σε θερμοκρασία 2-4 °C επί 48 ώρες ή σε θερμοκρασία - 18 °C για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

Παρατηρήσεις:

Οι διηθητικές μεμβράνες διαποτίζονται συχνά με τασιενεργά για υδροφιλίωση. Έτσι το φίλτρο μπορεί να περιέχει ορισμένα mg διαλυτού οργανικού άνθρακα που μπορούν να παρεμβληθούν στους προσδιορισμούς βιοαποικοδο-μησημότητα. Τα τασιενεργά και οι άλλες διαλυτές οργανικές ενώσεις απομακρύνονται από τα φίλτρα βάζοντας τα σε απιονισμένο νερό τρεις φορές για μία ώρα. Τα φίλτρα μπορούν κατόπιν να φυλάσσονται σε νερό για μία εβδομάδα. Εάν χρησιμοποιούνται φίλτρα μιας χρήσης κάθε παρτίδα πρέπει να ελέγχεται ότι δεν ελευθερώνει διαλυτό οργανικό άνθρακα.

▼B

Ανάλογα με τον τύπο της διηθητικής μεμβράνης η εξεταζόμενη χημική ουσία μπορεί να κατακρατείται με προσρόφηση. Κατά συνέπεια, ενδέχεται να απαιτείται να ελεγχθεί μήπως η εξεταζόμενη χημική ουσία κατακρατείται από το φίλτρο.

Φυγοκέντρηση με 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g) επί 15 λεπτά για τη διαφοροποίηση του TOC από τον DOC, μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί διήθησης. Η μέθοδος δεν είναι αξιόπιστη για αρχική συγκέντρωση < 10 mg DOC/l αφού είτε δεν απομακρύνονται όλα τα βακτήρια είτε ο άνθρακας σαν μέρος του βακτηριακού πλάσματος επαναδιαλύεται.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

— Standard Methods for the Examination of Water and Waste water, 12th, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

▼B

Παραρτημα III

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΑΣΘΕΝΩΣ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Σε δοκιμές βιοδιασπασιμότητας με ασθενώς διαλυτές ουσίες ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στις ακόλουθες πλευρές του θέματος.

Ενώ τα ομοιογενή υγρά σπανίως παρουσιάζουν προβλήματα δειγματοληψίας, συνιστάται όπως τα στερεά υλικά ομοιογενοποιούνται με κατάλληλα μέσα για να αποφεύγονται λάθη που οφείλονται στη μη ομοιογένεια τους. Ιδιαίτερη πρόνοια πρέπει να λαμβάνεται όταν απαιτούνται αντιπροσωπευτικά δείγματα λίγων χιλιοστογράμμων από μείγματα χημικών προϊόντων ή ουσιών με μεγάλες ποσότητες προσμείξεων.

Κατά τη διάρκεια των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μορφές ανάδευσης. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή ώστε η ανάδευση να είναι τόση όση απαιτείται ώστε να διατηρείται απλά και μόνο σε διασπορά το χημικό προϊόν και να αποφεύγεται η υπερθέρμανση, ο υπερβολικός αφρισμός και οι υπερβολικές δυνάμεις διάτμησης.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιος γαλακτωματοποιητής που να επιτυγχάνει σταθερή διασπορά του χημικού προϊόντος. Ο γαλακτωματοποιητής δεν θα πρέπει να είναι τοξικός για τα βακτήρια και δεν πρέπει να βιοαποικοδομείται ή να προκαλεί αφρισμό στις συνθήκες της δοκιμής.

Για τους διαλύτες ισχύουν τα ίδια κριτήρια όπως και για τους γαλακτωματοποιητές.

Οι στερεοί φορείς δεν συνιστάται να χρησιμοποιούνται για στερεές εξεταζόμενες ουσίες, μπορεί όμως να είναι κατάλληλοι για ελαιώδεις ουσίες.

Όταν χρησιμοποιούνται βοηθητικές ουσίες όπως γαλακτωματοποιητές, διαλύτες και φορείς, θα πρέπει να εκτελείται τυφλή δοκιμή με την βοηθητική ουσία.

Για τη μελέτη της βιοαποικοδομησιμότητας ασθενώς διαλυτών ενώσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε από τις τρεις αναπνευσιομετρικές δοκιμές CO_2, BOD και MITI.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol 16, 833.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13, 169.

▼B

Παραρτημα IV

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ

Όταν ένα χημικό προϊόν υποβάλλεται σε δοκιμασία άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας και φαίνεται να είναι μη βιοαποικοδομήσιμο, συνιστάται η ακόλουθη διαδικασία εφόσον επιθυμείται να γίνει διάκριση μεταξύ αναστολής και αδρανείας {Reynolds et al., 1987).

Για την τοξικότητα και τις δοκιμές βιοαποικοδόμησης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παρόμοια ή ταυτόσημα εμβόλια.

Η εκτίμηση της τοξικότητας της εξεταζόμενης ουσίας σε δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας, μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή μιας ή ενός συνδυασμού από τις μεθόδους της αναστολής ρυθμού αναπνοής λάσπης (δοκιμή αναστολής αναπνοής ενεργοποιημένης λάσπης-οδηγία 88/302/ΕΟΚ), BOD και/ή Αναστολής Ανάπτυξης.

Εάν πρέπει να αποφευχθεί η αναστολή εξαιτίας τοξικότητας, συνιστάται οι συγκεντρώσεις της εξεταζόμενης ουσίας, που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας να είναι μικρότερες του 1/10 των τιμών EC_{50} (ή μικρότερες των τιμών EC_{20}) που λαμβάνονται από τη δοκιμή τοξικότητας. Ενώσεις με τιμή EC_{50} μεγαλύτερη από 300 mg/l δεν μπορούν, κατά πάσα πιθανότητα, να εμφανίσουν τοξική δράση κατά τις δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας.

Τιμές EC_{50} μεγαλύτερες από 20 mg/l είναι πιθανόν να δημιουργήσουν σοβαρά προβλήματα στη μετέπειτα δοκιμή. Θα πρέπει στη δοκιμή να χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις πράγμα που έχει σαν αποτέλεσμα την ανάγκη χρήσης της αυστηρής και ευαίσθητης δοκιμής της κλειστής φιάλης ή χρήσης υλικού ιχνηθετημένου με ^{14}C. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις εξεταζόμενης ουσίας εφόσον χρησιμοποιηθεί εγκλιματισμένο εμβόλιο. Παρ' όλα αυτά, στην τελευταία αυτή περίπτωση χάνεται το ειδικό κριτήριο της δοκιμής άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol 16, 2259.

▼B

Παραρτημα V

ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΩΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΓΙΑ ΝΑ ΛΗΦΘΕΙ ΥΠΟΨΗ Η ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Τα σφάλματα που οφείλονται στο μη υπολογισμό της νιτροποίησης κατά την εκτίμηση, μέσω της ανάλωσης οξυγόνου, της βιοαποικοδόμησης ουσιών που δεν περιέχουν N είναι μικρά (όχι μεγαλύτερα από 5 %), ακόμη κι αν η οξείδωση του αμμωνιακού N στο μέσον της αντίδρασης συμβαίνει ακανόνιστα όπως μεταξύ δοχείων δοκιμής και τυφλού. Παρ' όλα αυτά, στην περίπτωση εξέτασης ουσιών που περιέχουν N, μπορούν να προκύψουν σοβαρά σφάλματα.

Εάν επέλθει νιτροποίηση, όχι όμως πλήρης, η παρατηρούμενη ανάλωση οξυγόνου από το μείγμα που αντιδρά μπορεί να διορθωθεί σε σχέση με την ποσότητα οξυγόνου που χρησιμοποιείται για την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη και νιτρικά, εάν προσδιορισθούν οι αλλαγές στη συγκέντρωση κατά την επώαση νιτρωδών και νιτρικών με τη χρησιμοποίηση των ακόλουθων εξισώσεων:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Συνολική:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Από την εξίσωση (1), η ανάλωση οξυγόνου από 28 g αζώτου περιεχόμενα σε χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) κατά την οξείδωση προς νιτρώδη είναι 96 g, δηλ. ένας συντελεστής 3,43 (96/28). Με τον ίδιο τρόπο, από την εξίσωση (3), η ανάλωση οξυγόνου από 28 g αζώτου κατά την οξείδωση προς νιτρικά είναι 128 g, δηλαδή ένας συντελεστής 4,57 (128/28).

Αφού οι αντιδράσεις είναι αλληλοδιάδοχες, πραγματοποιούμενες από διάκριτα και διάφορα είδη βακτηρίων, είναι δυνατόν η συγκέντρωση των νιτρωδών να αυξηθεί ή να μειωθεί. Στην τελευταία περίπτωση, μπορεί να σχηματισθούν νιτρικά σε ισοδύναμη συγκέντρωση. Έτσι, το οξυγόνο που καταναλίσκεται κατά την παραγωγή νιτρικών είναι 4,57 πολλαπλασιασμένο με την αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών, ενώ το οξυγόνο που σχετίζεται με το σχηματισμό νιτρωδών είναι 3,43 πολλαπλασιασμένο με την αύξηση στη συγκέντρωση νιτρωδών ή ενώ κατά τη μείωση της συγκέντρωσης τους η απώλεια οξυγόνου είναι - 3,43 πολλαπλασιασμένο με τη μείωση στη συγκέντρωση.

Δηλαδή:

O_2 αναλώμενο στο σχηματισμό νιτρικών = 4,57 x αύξηση συγκέντρωσης νιτρικών-N (4)

και

O_2 αναλώμενο στο σχηματισμό νιτρωδών = 3,43 x αύξηση συγκέντρωσης νιτρωδών-N (5)

και

O_2-απωλεσθέν από εξαφάνιση νιτρωδών = μείωση συγκ. νιτρωδών-N × - 3,43 (6)

Έτσι ώστε

O_2-λόγω νιτροποίησης = ± 3,43 × αλλαγή συγκ. νιτρωδών-N + 4,57 × αύξ. συγκ. νιτρικών-N (7)

και έτσι

O_2-Ανάλωση O_2 λόγω οξείδωσης C = ολική παρατηρηθ. ανάλωση-ανάλωση λόγω νιτροποίησης (8)

Εναλλακτικά, εάν προσδιορισθεί μόνο ολικό οξειδωμένο N, η ανάλωση οξυγόνου λόγω νιτροποίησης μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι, σύμφωνα με μία πρώτη προσέγγιση, 4,57 × αύξηση στο οξειδωμένο N.

Η διορθωμένη τιμή για την κατανάλωση οξυγόνου λόγω οξείδωσης του C συγκρίνεται κατόπιν με την ThOD NH_3, όπως υπολογίζεται στο Παράρτημα II.

▼B

Γ.5. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ — ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΣ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σκοπός της μεθόδου είναι η μέτρηση του βιοχημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (BOD) στερεών ή υγρών οργανικών ουσιών.

Δεδομένα που λαμβάνονται με τη μέθοδο αυτή αναφέρονται σε υδατοδιαλυτές ενώσεις· πάντως, πτητικές ενώσεις καθώς και εκείνες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα μπορούν επίσης, τουλάχιστον κατ· αρχήν, να ελεγχθούν.

Η μέθοδος εφαρμόζεται μόνον σ' εκείνα τα οργανικά ελεγχόμενα υλικά που δεν παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στον έλεγχο. Αν το ελεγχόμενο υλικό δεν είναι διαλυτό στη συγκέντρωση του ελέγχου, μπορεί να χρειασθεί να χρησιμοποιηθούν ειδικές τεχνικές, τέτοιες όπως η χρήση υπέρηχων, για να επιτευχθεί καλή διασπορά της ελεγχόμενης ουσίας.

Πληροφορίες για την τοξικότητα της χημικής ουσίας μπορεί να είναι χρήσιμες για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Σαν BOD ορίζεται η μάζα του διαλελυμένου οξυγόνου που απαιτείται από ορισμένο όγκο διαλύματος της ουσίας για τη διαδικασία της βιοχημικής οξείδωσης υπό καθορισμένες συνθήκες.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε γραμμάρια BOD ανά γραμμάρια ελεγχόμενης ουσίας.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Είναι επιθυμητή η χρήση κατάλληλης ουσίας αναφοράς για τον έλεγχο της δραστικότητας του εμβολίου.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Γνωστή ποσότητα της ουσίας, διαλελυμένη ή σε διασπορά, σε καλά αεριζόμενο κατάλληλο μέσο, εμβολιάζεται με μικροοργανισμούς και επωάζεται σε σταθερή καθορισμένη θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι.

Το BOD προσδιορίζεται από τη διαφορά στη συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου στην αρχή και στο τέλος του ελέγχου. Η διάρκεια του ελέγχου πρέπει να είναι το λιγότερο πέντε και όχι περισσότερο από 28 ημέρες.

Πρέπει να γίνει ένας τυφλός προσδιορισμός σε παράλληλη δοκιμασία που δεν περιέχει ελεγχόμενη ουσία.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ο προσδιορισμός του BOD δεν μπορεί να θεωρηθεί σαν έγκυρος προσδιορισμός της βιοδιασπασιμότητας μιας ουσίας. Ο έλεγχος αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σαν βασικός έλεγχος.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Παρασκευάζεται προκαταρκτικό διάλυμα ή διασπορά της ουσίας με συγκέντρωση BOD κατάλληλη για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Προσδιορίζεται κατόπιν το BOD ακολουθώντας οποιαδήποτε κατάλληλη εθνική ή διεθνή τυποποιημένη μέθοδο.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ**

Υπολογίζεται το BOD που περιέχεται στο προκαταρκτικό διάλυμα σύμφωνα με την προτότυπη μέθοδο που έχει επιλεγεί και μετατρέπεται σε γραμμάρια BOD ανά γραμμάρια ελεγχόμενης ουσίας.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Πρέπει να δηλώνεται η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε.

Το βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο πρέπει να είναι ο μέσος όρος τριών τουλάχιστον έγκυρων μετρήσεων.

Πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ειδικά σε σχέση με τις ξένες προσμείξεις, φυσική κατάσταση, τοξικές επιδράσεις και σχετική σύνθεση της ουσίας που μπορεί να επηρεάζει τα αποτελέσματα.

Πρέπει να αναφέρεται η χρήση προσθετικών για την παρεμπόδιση της βιολογικής διατροφής.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κατάλογος των προτύπων μεθόδων, π.χ.:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4.: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

Γ.6. **ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ — ΧΗΜΙΚΩΣ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της μεθόδου είναι η μέτρηση του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD) στερεών ή υγρών οργανικών ουσιών με ένα πρότυπο αυθαίρετο τρόπο, υπό καθορισμένες εργαστηριακές συνθήκες.

Πληροφορίες για τον τύπο της ουσίας θα είναι χρήσιμες κατά την εκτέλεση του ελέγχου και την ερμηνεία του λαμβανόμενου αποτελέσματος (π.χ. αλογονούχα άλατα, σιδηρούχα άλατα οργανικών ενώσεων, οργανοχλωριούχες ενώσεις).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο είναι μέτρο της επιδεκτικότητας προς οξείδωση μιας ουσίας και εκφράζεται σαν το ισοδύναμο ποσό σε οξυγόνο ενός οξειδωτικού παράγοντα, που καταναλώνεται από την ουσία, υπό καθορισμένες εργαστηριακές συνθήκες.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε γραμμάρια COD ανά γραμμάρια ελεγχόμενης ουσίας.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουσίες αναφοράς δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάζεται μια νέα ουσία. Αυτό θα χρησίμευε, κατ' αρχή, για τη βαθμονόμηση της μεθόδου, από καιρό σε καιρό, και για να προσφέρει τη δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων σε περιπτώσεις που εφαρμόζεται άλλη μέθοδος.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Γνωστή ποσότητα της ουσίας διαλύεται ή διασπείρεται σε νερό, οξειδώνεται με διχρωμικό κάλιο σε ισχυρά όξινο με θειικό οξύ περιβάλλον, με θειικό άργυρο σαν καταλύτη, επί δύο ώρες υπό επαναρροή. Το υπόλοιπο διχρωμικό προσδιορίζεται με τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα εναμμώνιου θειικού σιδήρου.

Στην περίπτωση ουσιών που περιέχουν χλώριο, προστίθεται θειικός υδράργυρος για την ελάττωση της παρεμπόδισης από τα χλωριόντα ([1]).

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Εξ' αιτίας του αυθαίρετου τρόπου προσδιορισμού, το COD είναι ένας «δείκτης οξειδωσιμότητας» και συνεπώς χρησιμοποιείται σαν μία πρακτική μέθοδος προσδιορισμού της οργανικής ύλης.

Τα χλωριόντα μπορεί να παρεμβαίνουν στη δοκιμή αυτή· στον προσδιορισμό του COD μπορεί επίσης να παρεμβαίνουν και ανόργανοι αναγωγικοί ή οξειδωτικοί παράγοντες.

Ορισμένες κυκλικές ενώσεις και πολλές πτητικές ουσίες (π.χ. κατώτερα λιπαρά οξέα) δεν οξειδώνονται πλήρως στη δοκιμή αυτή.

Μετά από τη χρησιμοποίηση τους, τα διαλύματα που περιέχουν άλατα υδραργύρου θα πρέπει να υποβάλλονται σε κατεργασία για να αποφεύγεται η διασπορά υδραργύρου στο περιβάλλον.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Παρασκευάζεται προκαταρκτικό διάλυμα ή διασπορά της ουσίας με το COD μεταξύ 250 και 600 mg/l.

([1]) Μετά από τη χρησιμοποίηση τους, τα διαλύματα που περιέχουν άλατα υδραργύρου θα πρέπει να υποβάλλονται σε κατεργασία για να αποφεύγεται η διασπορά υδραργύρου στο περιβάλλον.

▼B

Παρατήρηση:

Στην περίπτωση ουσιών με χαμηλή διαλυτότητα όταν δεν μπορούν να σχηματίσουν διασπορά, ζυγίζεται ποσότητα λεπτής σκόνης της ουσίας, ή υγρής ουσίας, αντίστοιχη με 5 mg COD και φέρεται στην πειραματική συσκευή με νερό.

Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD) συχνά και ιδιαίτερα στην περίπτωση ουσιών με χαμηλή διαλυτότητα, προσδιορίζεται καλύτερα με μία παραλλαγή της μεθόδου, δηλ. σε κλειστό σύστημα με εξισωτή πίεσης (H. Kelkenberg, 1975). Με την τροποποίηση αυτή, ενώσεις που μόνο με δυσκολία προσδιορίζονται με τη συμβατική μέθοδο. π.χ. οξεικό οξύ — μπορούν συχνά να προσδιορίζονται ποσοτικά με επιτυχία. Εντούτοις, η μέθοδος δεν έχει και πάλι εφαρμογή στην περίπτωση πυριδίνης. Αν η συγκέντρωση του διχρωμικού καλίου, όπως αυτή προδιαγράφεται στην παραπομπή (1), αυξηθεί σε 0,25 N (0,0416 M), η άμεση αποτίμηση 5-10 mg ουσίας, διευκολύνεται γεγονός που είναι βασικό για τον προσδιορισμό του COD ασθενώς υδατοδιαλυτών ουσιών (παραπομπή 2).

Διαφορετικά, το COD προσδιορίζεται τότε ακολουθώντας οποιαδήποτε εθνική ή διεθνή τυποποιημένη μέθοδο.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Υπολογίζεται το COD που περιέχεται στην πειραματική φιάλη, σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο που έχει επιλεγεί και μετατρέπεται σε γραμμάρια COD ανά γραμμάρια ελεγχόμενης ουσίας.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Πρέπει να δηλώνεται η μέθοδος που χρμσιμοποιήθηκε.

Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο πρέπει να είναι ο μέσος όρος τριών τουλάχιστον μετρήσεων. Πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ειδικά σε σχέση με τις ξένες προσμείξεις, τη φυσική κατάσταση και τις σχετικές ιδιότητες της ουσίας (εάν είναι γνωστές) που μπορεί να επηρεάζουν τα αποτελέσματα.

Πρέπει να αναφέρεται η χρήση θειικού υδραργύρου που μειώνει την παρεμπόδιση των χλωριόντων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Kelkenberg, H. Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Κατάλογος προτύπων μεθόδων, π.χ.:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 — water Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

Γ.7. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ — ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ: ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΩΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΤΟΥ pH

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 111 (2004) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι χημικές ουσίες μπορούν να εισέλθουν στα επιφανειακά ύδατα με τρόπους όπως η άμεση τοποθέτηση, η μετατόπιση αερολυμάτων, η απορροή, η αποστράγγιση, η απόρριψη (διάθεση) αποβλήτων, τα βιομηχανικά, οικιακά ή γεωργικά λύματα και οι ατμοσφαιρικές εναποθέσεις, ενώ μπορούν να μετατραπούν στα εν λόγω ύδατα με χημικές (π.χ. υδρόλυση, οξείδωση), φωτοχημικές και/ή μικροβιακές διεργασίες. Στις παρούσες κατευθυντήριες γραμμές, που βασίζονται σε υφιστάμενες κατευθυντήριες γραμμές (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7), περιγράφεται μία εργαστηριακή μέθοδος δοκιμών για την εκτίμηση των αβιοτικών υδρολυτικών μετατροπών χημικών ουσιών σε υδάτινα συστήματα, σε τιμές pH που απαντούν υπό κανονικές συνθήκες στο περιβάλλον (pH 4-9).

Τα πειράματα εκτελούνται με σκοπό να προσδιοριστούν (i) η ταχύτητα υδρόλυσης της ελεγχόμενης ουσίας ως συνάρτηση του pH και (ii) η ταυτότητα ή η φύση και οι ταχύτητες σχηματισμού και αποικοδόμησης των προϊόντων υδρόλυσης στα οποία είναι δυνατή η έκθεση οργανισμών. Οι μελέτες αυτές ενδέχεται να απαιτούνται για τις χημικές ουσίες που φέρονται απευθείας στα ύδατα ή που ενδέχεται να φθάσουν στο περιβάλλον με τους άλλους, προαναφερθέντες τρόπους.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Βλ. παράρτημα 2.

1.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος εφαρμόζεται εν γένει στις χημικές ουσίες (ραδιοσημασμένες και μη) για τις οποίες υπάρχει αναλυτική μέθοδος επαρκούς ακρίβειας και ευαισθησίας. Εφαρμόζεται σε ελαφρώς πτητικές και μη πτητικές ενώσεις επαρκούς υδατοδιαλυτότητας. Η δοκιμή δεν πρέπει να εφαρμόζεται σε χημικές ουσίες που είναι πολύ πτητικές από το νερό (π.χ. μέσα υποκαπνισμού, οργανικοί διαλύτες) και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να διατηρηθούν διαλελυμένες υπό τις πειραματικές συνθήκες της συγκεκριμένης δοκιμής. Η διεξαγωγή της δοκιμής ενδέχεται να είναι δύσκολη με ουσίες ελάχιστης υδατοδιαλυτότητας (8).

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η ελεγχόμενη ουσία φέρεται σε στείρα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα διαφόρων τιμών pH (pH 4, 7 και 9) και το σύνολο επωάζεται στο σκοτάδι υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες (σε σταθερές θερμοκρασίες). Ανά κατάλληλα τακτά χρονικά διαστήματα, τα ρυθμιστικά διαλύματα υποβάλλονται σε ανάλυση για την ελεγχόμενη ουσία και τα προϊόντα υδρόλυσης. Με ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη ουσία (π.χ. ^{14}C), διευκολύνεται ο προσδιορισμός του ισοζυγίου μάζας.

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί με βαθμιδωτή προσέγγιση, η οποία παρατίθεται και εξηγείται στο παράρτημα 1. Η εκκίνηση κάθε βαθμίδας εξαρτάται από τα αποτελέσματα της προηγούμενης βαθμίδας.

▼B

1.5. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Για τη μέτρηση της ταχύτητας υδρόλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ραδιοσημασμένες και μη ραδιοσημασμένες ελεγχόμενες ουσίες. Το ραδιοσημασμένο υλικό προτιμάται, γενικά, για τη μελέτη της πορείας της υδρόλυσης, καθώς και για τον προσδιορισμό του ισοζυγίου μάζας· ωστόσο, σε ειδικές περιπτώσεις, η ραδιοσήμανση ενδέχεται να μην είναι απολύτως αναγκαία. Συνιστάται η ραδιοσήμανση με ^{14}C, πλην όμως η χρήση άλλων ισοτόπων, όπως των ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ενδέχεται να είναι επίσης χρήσιμη. Στο μέτρο του δυνατού, το ισότοπο πρέπει να τοποθετείται στο(στα) σταθερότερο(α) μέρος(η) του μορίου. Παραδείγματος χάριν, εάν η ελεγχόμενη ουσία περιέχει έναν δακτύλιο, είναι απαραίτητη η ραδιοσήμανση στον δακτύλιο αυτό· σε περίπτωση κατά την οποία η ελεγχόμενη ουσία περιέχει δύο ή περισσότερους δακτυλίους, ενδέχεται να είναι αναγκαία η διεξαγωγή χωριστών μελετών, ώστε να εξετάζεται η πορεία κάθε ραδιοσημασμένου δακτυλίου και να λαμβάνονται κατάλληλες πληροφορίες για τον σχηματισμό προϊόντων υδρόλυσης. Η καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να είναι τουλάχιστον 95 %.

Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμής υδρόλυσης, πρέπει να υπάρχουν οι ακόλουθες πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία:

(α) υδατοδιαλυτότητα [μέθοδος δοκιμών Α.6],

(β) διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες,

(γ) τάση ατμών [μέθοδος δοκιμών Α.4] και/ή σταθερά του Νόμου του Henry,

(δ) συντελεστής κατανομής σε μίγμα n-οκτανόλης/νερού [μέθοδος δοκιμών Α.8],

(ε) σταθερά διαστάσεως (pK_a) [κατευθυντήρια γραμμή 112 του ΟΟΣΑ] (9),

(στ) ταχύτητα άμεσης και έμμεσης φωτομετατροπής στο νερό, κατά περίπτωση.

Πρέπει να υπάρχουν αναλυτικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας και, όπου είναι σκόπιμο, για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων υδρόλυσης σε υδατικά διαλύματα (βλ. επίσης σημείο 1.7.2).

1.6. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Όποτε αυτό είναι δυνατό, πρέπει να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων υδρόλυσης με φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές μεθόδους ή άλλες, κατάλληλες ευαίσθητες μεθόδους.

1.7. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

1.7.1. **Ανάκτηση**

Η ανάλυση τουλάχιστον διπλού δείγματος των ρυθμιστικών διαλυμάτων ή των εκχυλισμάτων τους αμέσως μετά την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας παρέχει μια πρώτη ένδειξη της επαναληπτικότητας της αναλυτικής μεθόδου και της ομοιομορφίας της διαδικασίας προσθήκης ως προς την ελεγχόμενη ουσία. Η ανάκτηση για τα μεταγενέστερα στάδια των πειραμάτων δίδεται από τα αντίστοιχα ισοζύγια μάζας (όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένο υλικό). Η ανάκτηση πρέπει να κυμαίνεται από 90 % έως 110 % για τις ραδιοσημασμένες και μη ραδιοσημασμένες χημικές ουσίες (7). Σε περίπτωση που είναι τεχνικά δύσκολο να επιτευχθεί το εν λόγω εύρος τιμών, γίνεται δεκτή ανάκτηση της τάξεως του 70 % για τις μη ραδιοσημασμένες χημικές ουσίες, συνοδευόμενη όμως από σχετική αιτιολόγηση.

▼B

1.7.2. **Ενδοεργαστηριακή επαναληπτικότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου**

Η ενδοεργαστηριακή επαναληπτικότητα της(των) αναλυτικής(ών) μεθόδου(ων) που χρησιμοποιείται(ούνται) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας και των προϊόντων υδρόλυσης σε μεταγενέστερα στάδια μπορεί να ελεγχθεί με διπλή ανάλυση δείγματος των ίδιων ρυθμιστικών διαλυμάτων (ή των εκχυλισμάτων τους), αφού σχηματιστούν επαρκείς για τον ποσοτικό προσδιορισμό ποσότητες προϊόντων υδρόλυσης.

Η αναλυτική μέθοδος πρέπει να είναι αρκούντως ευαίσθητη για τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας μέχρι ποσοστού 10 % ή λιγότερο της αρχικής συγκέντρωσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι αναλυτικές μέθοδοι πρέπει επίσης να είναι αρκούντως ευαίσθητες ώστε να επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό προϊόντων υδρόλυσης που αντιστοιχούν στο 10 % ή περισσότερο της χρησιμοποιούμενης δόσης (σε οποιαδήποτε φάση της μελέτης) μέχρι ποσοστού 25 % ή λιγότερο της κορυφαίας συγκέντρωσής τους.

1.7.3. **Διαστήματα εμπιστοσύνης για τα κινητικά δεδομένα της υδρόλυσης**

Πρέπει να υπολογίζονται με ηλεκτρονικό υπολογιστή και να παρουσιάζονται διαστήματα εμπιστοσύνης για όλους τους συντελεστές παλινδρόμησης, τις σταθερές ταχύτητας, τους χρόνους ημίσειας ζωής, καθώς και για κάθε άλλη κινητική παράμετρο (π.χ. DT50).

1.8. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.8.1. **Εργαστηριακά σκεύη και όργανα**

Η μελέτη πρέπει να διεξάγεται σε γυάλινους περιέκτες (π.χ. δοκιμαστικούς σωλήνες, μικρές φιάλες) στο σκοτάδι και υπό στείρες συνθήκες, εφόσον αυτό είναι αναγκαίο, εκτός εάν προηγούμενες πληροφορίες (όπως, λόγου χάριν, ο συντελεστής κατανομής σε μίγμα n-οκτανόλης/νερού) υποδηλώνουν ότι η ελεγχόμενη ουσία ενδέχεται να προσκολλάται στο γυαλί. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να εξετάζεται η χρήση εναλλακτικών υλικών (όπως του Teflon). Είναι δυνατή επίσης η άμβλυνση του προβλήματος προσκόλλησης στο γυαλί με τη χρήση μίας ή περισσότερων από τις ακόλουθες μεθόδους:

— προσδιορισμός της μάζας της ελεγχόμενης ουσίας και των προϊόντων υδρόλυσης που υφίστανται ρόφηση στο δοχείο της δοκιμής,

— χρήση λουτρού υπερήχων,

— έκπλυση όλων των γυάλινων σκευών με διαλύτη σε κάθε δειγματοληπτικό διάστημα,

— χρήση μορφοποιημένων προϊόντων,

— χρήση αυξημένης ποσότητας συνδιαλύτη για την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας στο σύστημα· σε περίπτωση χρήσης συνδιαλύτη, ο τελευταίος δεν πρέπει να υδρολύει την ελεγχόμενη ουσία.

Κατά κανόνα απαιτούνται θερμοστατούμενα, ανακινούμενα υδατόλουτρα ή θερμοστατικά ελεγχόμενοι επωαστές για την επώαση των διαφόρων διαλυμάτων δοκιμής.

Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός ο οποίος περιλαμβάνει, ειδικότερα:

— πεχάμετρο·

▼B

— αναλυτικά όργανα, όπως συσκευές αέριας χρωματογραφίας (GC), υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), συμπεριλαμβανομένων κατάλληλων συστημάτων ανίχνευσης για την ανάλυση ραδιοσημασμένων και μη ραδιοσημασμένων ουσιών ή για τη μέθοδο αντίστροφης αραίωσης ισοτόπων

— όργανα ταυτοποίησης (π.χ. φασματομετρίας μάζας (MS), αέριας χρωματογραφίας — φασματομετρίας μάζας (GC-MS), υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης — φασματομετρίας μάζας (HPLC-MS), φασματομετρίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), κλπ.)·

— απαριθμητή υγρού σπινθηρισμού·

— διαχωριστικές χοάνες για εκχύλιση υγρού — υγρού·

— συσκευές για τη συμπύκνωση διαλυμάτων και εκχυλισμάτων (π.χ. περιστρεφόμενος εξατμιστήρας)·

— συσκευή ελέγχου της θερμοκρασίας (π.χ. υδατόλουτρο).

Τα χημικά αντιδραστήρια περιλαμβάνουν, π.χ.:

— οργανικούς διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας, όπως εξάνιο, διχλωρομεθάνιο, κλπ.,

— υγρό σπινθηρισμού,

— ρυθμιστικά διαλύματα (για λεπτομέρειες, βλ. σημείο 1.8.3).

Όλα τα γυάλινα σκεύη, το νερό καθαρότητας αντιδραστηρίου και τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές υδρόλυσης, πρέπει να αποστειρώνονται.

1.8.2. **Προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας**

Η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να προστίθεται ως υδατικό διάλυμα στα διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα (βλ. παράρτημα 3). Εάν είναι αναγκαίο για την επαρκή διάλυση, η χρήση μικρών ποσοτήτων διαλυτών που αναμειγνύονται με το νερό (όπως το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη, η αιθανόλη) επιτρέπεται για την προσθήκη και κατανομή της ελεγχόμενης ουσίας, πλην όμως δεν πρέπει, κατά κανόνα, να υπερβαίνει το 1 % v/v. Εάν εξετάζεται το ενδεχόμενο να χρησιμοποιηθεί υψηλότερη συγκέντρωση διαλυτών (π.χ. στην περίπτωση δυσδιάλυτων ελεγχόμενων ουσιών), αυτό επιτρέπεται μόνο όταν είναι δυνατόν να καταδειχθεί ότι ο διαλύτης δεν επηρεάζει την υδρόλυση των ελεγχόμενων ουσιών.

Η χρήση μορφοποιημένων προϊόντων ως συνήθης πρακτική δεν συνιστάται, δεδομένου ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να επηρεαστεί η διαδικασία υδρόλυσης από τα συστατικά του μορφοποιημένου προϊόντος. Ωστόσο, για δυσδιάλυτες στο νερό ελεγχόμενες ουσίες ή ουσίες που προσκολλώνται στο γυαλί (βλ. σημείο 1.8.1), η χρήση μορφοποιημένων υλικών ενδέχεται να αποτελεί κατάλληλη εναλλακτική λύση.

Πρέπει να χρησιμοποιείται μία και μόνη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας· αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,01 M ή το ήμισυ της συγκέντρωσης κορεσμού (βλ. παράρτημα 1).

▼B

1.8.3. **Ρυθμιστικά διαλύματα**

Η δοκιμή υδρόλυσης πρέπει να διεξάγεται σε τιμές pH 4, 7 και 9. Για το σκοπό αυτό, πρέπει να παρασκευάζονται ρυθμιστικά διαλύματα με την χρήση χημικών ουσιών και νερού καθαρότητας αντιδραστηρίου. Ορισμένα χρήσιμα ρυθμιστικά συστήματα περιγράφονται στο παράρτημα 3. Σημειωτέον ότι το χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό σύστημα μπορεί να επηρεάσει την ταχύτητα της υδρόλυσης και, όταν αυτό παρατηρείται, πρέπει να χρησιμοποιείται εναλλακτικό ρυθμιστικό σύστημα ([1]).

Το pH κάθε ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να ελέγχεται με βαθμονομημένο πεχάμετρο, με ακρίβεια τουλάχιστον 0,1, στην απαιτούμενη θερμοκρασία.

1.8.4. **Συνθήκες δοκιμής**

1.8.4.1. *Θερμοκρασία δοκιμής*

Τα πειράματα υδρόλυσης πρέπει να εκτελούνται σε σταθερές θερμοκρασίες. Για λόγους παρέκτασης, είναι σημαντικό να επιτυγχάνεται σταθερότητα θερμοκρασίας τουλάχιστον ± 0,5 °C.

Στην περίπτωση που η υδρολυτική συμπεριφορά της ελεγχόμενης ουσίας δεν είναι γνωστή, πρέπει να διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή (βαθμίδα 1) σε θερμοκρασία 50 °C. Οι κινητικές δοκιμές ανώτερων βαθμίδων πρέπει να εκτελούνται σε τρεις τουλάχιστον θερμοκρασίες (συμπεριλαμβανομένης δοκιμής στους 50 °C), εκτός εάν η ελεγχόμενη ουσία είναι σταθερή στην υδρόλυση, όπως προκύπτει από τη δοκιμή της βαθμίδας 1. Ένα συνιστώμενο πεδίο τιμών θερμοκρασίας είναι 10-70 °C (κατά προτίμηση με τη χρήση μίας τουλάχιστον θερμοκρασίας κάτω των 25 °C), το οποίο περικλείει τη θερμοκρασία αναφοράς 25 °C και τις περισσότερες από τις θερμοκρασίες που συναντώνται στο ύπαιθρο.

1.8.4.2. *Φως και οξυγόνο*

Όλες οι υδρολυτικές δοκιμές πρέπει να διεξάγονται με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων, ώστε να αποφεύγονται τα φωτολυτικά φαινόμενα. Πρέπει να λαμβάνεται κάθε κατάλληλο μέτρο ώστε να αποφεύγεται το οξυγόνο (π.χ. με τη διοχέτευση φυσαλίδων ηλίου, αζώτου ή αργού για διάστημα 5 λεπτών πριν από την παρασκευή του διαλύματος).

1.8.4.3. *Διάρκεια της δοκιμής*

Η προκαταρκτική δοκιμή πρέπει να διεξάγεται επί πενθήμερο, ενώ οι δοκιμές ανώτερων βαθμίδων πρέπει να διενεργούνται μέχρι να υδρολυθεί το 90 % της ελεγχόμενης ουσίας ή επί 30 ημέρες, ανάλογα με το ποιο από τα δύο χρονικά διαστήματα είναι μικρότερο.

1.8.5. **Εκτέλεση της δοκιμής**

1.8.5.1. *Προκαταρκτική δοκιμή (βαθμίδα 1)*

Η προκαταρκτική δοκιμή εκτελείται σε θερμοκρασία 50 ± 0,5 °C και pH 4,0, 7,0 και 9,0. Εάν μετά από 5 ημέρες παρατηρείται υδρόλυση μικρότερη του 10 τοις εκατό ($t0.5_{25\,^{\circ}C}$ > 1 έτος), η ελεγχόμενη ουσία θεωρείται υδρολυτικώς σταθερή και, κατά κανόνα, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν είναι γνωστό ότι η ουσία είναι ασταθής σε περιβαλλοντικώς σημαντικές θερμοκρασίες ([2]), δεν απαιτείται προκαταρκτική δοκιμή. Η αναλυτική μέθοδος πρέπει να είναι αρκούντως ακριβής και ευαίσθητη ώστε να ανιχνεύει μία κατά 10 τοις εκατό μείωση της αρχικής συγκέντρωσης.

([1]) Οι Mabey και Mill συνιστούν τη χρήση βορικών ή οξικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, αντί των φωσφορικών (11).

([2]) Οι σχετικές πληροφορίες ενδέχεται να προέρχονται από άλλες πηγές, όπως τα βιβλιογραφικά δεδομένα για την υδρόλυση ενώσεων ανάλογης δομής, ή από άλλες, προκαταρτικές ημι-ποσοτικές δοκιμές υδρόλυσης με την ελεγχόμενη ουσία, σε προγενέστερο στάδιο ανάπτυξης.

▼B

1.8.5.2. *Υδρόλυση ασταθών ουσιών (βαθμίδα 2)*

Η δοκιμή της ανώτερης βαθμίδας (προηγμένη) πρέπει να εκτελείται στις τιμές pH στις οποίες η ελεγχόμενη ουσία διαπιστώθηκε ότι είναι ασταθής, βάσει της προαναφερθείσας προκαταρκτικής δοκιμής. Τα ρυθμιστικά διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να διατηρούνται στις επιλεγμένες θερμοκρασίες. Προκειμένου να ελεγχθεί η συμπεριφορά πρώτης τάξεως, κάθε διάλυμα αντίδρασης πρέπει να αναλύεται ανά χρονικά διαστήματα που εξασφαλίζουν τουλάχιστον έξι σημεία διατεταγμένα μεταξύ επιπέδων υδρόλυσης της ελεγχόμενης ουσίας 10 % και 90 %. Πρέπει να λαμβάνονται επιμέρους δείγματα πολλαπλού προσδιορισμού (τουλάχιστον δύο σε χωριστές φιάλες) και να αναλύεται το περιεχόμενό τους τουλάχιστον σε έξι χρόνους δειγματοληψίας (ώστε να προκύπτουν τουλάχιστον δώδεκα σημεία δεδομένων). Η χρήση ενός και μόνου δείγματος χύδην, από το οποίο λαμβάνονται επιμέρους κατάλληλες ποσότητες του ελεγχόμενου διαλύματος σε κάθε δειγματοληπτικό μεσοδιάστημα θεωρείται ανεπαρκής, επειδή δεν επιτρέπει την ανάλυση της μεταβλητότητας (διακύμανσης) των δεδομένων και ενδέχεται να προκαλέσει προβλήματα μόλυνσης του διαλύματος της δοκιμής. Στο τέλος της δοκιμής της ανώτερης βαθμίδας (δηλ. όταν έχει επιτευχθεί υδρόλυση 90 % ή έχουν παρέλθει 30 ημέρες) πρέπει να διενεργούνται έλεγχοι για τη επιβεβαίωση της στειρότητας. Ωστόσο, εάν δεν παρατηρηθεί αποικοδόμηση (δηλαδή μετατροπή), οι έλεγχοι στειρότητας δεν θεωρούνται αναγκαίοι.

1.8.5.3. *Ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων υδρόλυσης (βαθμίδα 3)*

Κάθε σημαντικό προϊόν υδρόλυσης, τουλάχιστον δε αυτά που αντιπροσωπεύουν ποσοστό > 10 % της χρησιμοποιούμενης δόσης, πρέπει να ταυτοποιείται με κατάλληλες αναλυτικές μεθόδους.

1.8.5.4. *Προαιρετικές δοκιμές*

Για υδρολυτικώς ασταθείς ελεγχόμενες ουσίες ενδέχεται να απαιτούνται πρόσθετες δοκιμές σε τιμές pH εκτός των τιμών 4, 7 και 9. Λόγου χάριν, για λόγους φυσιολογίας, ενδέχεται να απαιτείται δοκιμή υπό περισσότερο όξινες συνθήκες (π.χ. pH 1,2), με τη χρήση μιας και μόνης φυσιολογικώς κατάλληλης θερμοκρασίας (37 °C).

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Οι ποσότητες των ελεγχόμενων ουσιών και, εάν έχουν σημασία, των προϊόντων υδρόλυσης πρέπει να εκφράζονται σε % της χρησιμοποιηθείσας αρχικής συγκέντρωσης και, ενδεχομένως, σε mg/l για κάθε διάστημα δειγματοληψίας και για κάθε pH και θερμοκρασία δοκιμής. Επιπλέον, όταν έχει χρησιμοποιηθεί ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη ουσία, πρέπει να παρέχεται το ισοζύγιο μάζας σε επί τοις εκατό ποσοστό της χρησιμοποιηθείσας αρχικής συγκέντρωσης.

Πρέπει να παρέχεται γραφική παράσταση του λογάριθμου των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας σε συνάρτηση με τον χρόνο. Πρέπει να ταυτοποιούνται τα κύρια προϊόντα υδρόλυσης, τουλάχιστον δε αυτά που αντιπροσωπεύουν ποσοστό ≥ 10 % της χρησιμοποιηθείσας δόσης και να χαράσσεται η καμπύλη του λογάριθμου των συγκεντρώσεών τους, όπως για τη μητρική ουσία, ώστε να εμφαίνονται οι αντίστοιχες ταχύτητες σχηματισμού και αποικοδόμησης.

▼B

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι χρόνοι ημίσειας ζωής ή οι τιμές DT50 πρέπει να προσδιορίζονται ακριβέστερα με κατάλληλους υπολογισμούς κινητικού μοντέλου. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής και/ή τιμές DT_{50} (συμπεριλαμβανομένων των ορίων εμπιστοσύνης) πρέπει να αναφέρονται για κάθε pH και θερμοκρασία, συνοδευόμενοι από περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος μοντέλου, της τάξεως της κινητικής και του συντελεστή προσδιορισμού (r^2). Όπου ενδείκνυται, οι υπολογισμοί πρέπει να εφαρμόζονται και στα προϊόντα υδρόλυσης.

Σε περίπτωση μελετών ταχύτητας που διεξάγονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες, πρέπει να δίδονται οι σταθερές ταχύτητας υδρόλυσης ψευδο-πρώτης τάξεως (k_{obs}) συναρτήσει της θερμοκρασίας. Ο υπολογισμός πρέπει να στηρίζεται στον διαχωρισμό των k_{obs} σε σταθερές ταχύτητας για την υδρόλυση σε όξινο, ουδέτερο και αλκαλικό περιβάλλον (k_H, $k_{neutral}$, και k_{OH} αντιστοίχως), καθώς και στην εξίσωση του Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

όπου A_i και B_i είναι σταθερές παλινδρόμησης από το σημείο τομής και την κλίση, αντιστοίχως, των καμπυλών που διέρχονται από τα περισσότερα σημεία μετά από γραμμική παλινδρόμηση του ln k_i έναντι του αντιστρόφου της απόλυτης θερμοκρασίας σε βαθμούς Kelvin (T). Με τη βοήθεια των εξισώσεων του Arrhenius για την υδρόλυση σε όξινο, ουδέτερο και αλκαλικό περιβάλλον, μπορούν να υπολογιστούν οι σταθερές ταχύτητας ψευδο-πρώτης τάξεως και, συνεπώς, οι χρόνοι ημίσειας ζωής για άλλες θερμοκρασίες, για τις οποίες δεν είναι πρακτικά δυνατός ο άμεσος πειραματικός προσδιορισμός σταθεράς της ταχύτητας (10).

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι περισσότερες υδρολυτικές αντιδράσεις έχουν φαινόμενες ταχύτητες αντίδρασης πρώτης τάξεως και, ως εκ τούτου, οι χρόνοι ημίσειας ζωής είναι ανεξάρτητοι από τη συγκέντρωση (βλ. εξίσωση 4 στο παράρτημα 2). Το γεγονός αυτό επιτρέπει, κατά κανόνα, την εφαρμογή των εργαστηριακών αποτελεσμάτων που προσδιορίζονται σε συγκεντρώσεις 10^{-2} έως 10^{-3} M στις περιβαλλοντικές συνθήκες (< 10^{-6} M) (10). Από τους Mabey και Mill (11) έχουν αναφερθεί αρκετά παραδείγματα ικανοποιητικής συμφωνίας μεταξύ των ταχυτήτων υδρόλυσης που μετρήθηκαν τόσο σε καθαρά, όσο και σε φυσικά ύδατα για ποικιλία χημικών ενώσεων, υπό τον όρο ότι είχαν μετρηθεί τόσο το pH, όσο και η θερμοκρασία.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση για τη δοκιμή πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθ. CAS, συντακτικός τύπος (όπου εμφαίνεται η θέση του ιχνηθέτη/ισοτόπου, όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένο υλικό) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. τμήμα 1.5),

— καθαρότητα (προσμείξεις) της ελεγχόμενης ουσίας,

— καθαρότητα ισοτόπου για τη ραδιοσημασμένη χημική ουσία και μοριακή δραστικότητα (κατά περίπτωση).

▼B

— Ρυθμιστικά διαλύματα:

— ημερομηνίες και λεπτομέρειες παρασκευής,

— χρησιμοποιηθέντα ρυθμιστικά διαλύματα και ύδατα,

— μοριακότητα και pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Συνθήκες δοκιμής:

— ημερομηνίες διεξαγωγής των μελετών,

— ποσότητα της χρησιμοποιηθείσας ελεγχόμενης ουσίας,

— μέθοδος και διαλύτες (τύπος και ποσότητα) που χρησιμοποιήθηκαν για την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας,

— όγκος επωασθέντων με την ελεγχόμενη ουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων,

— περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος συστήματος επώασης,

— pH και θερμοκρασία κατά τη μελέτη,

— χρόνοι δειγματοληψίας,

— μέθοδος(οι) εκχύλισης,

— μέθοδοι ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού της ελεγχόμενης ουσίας και των οικείων προϊόντων υδρόλυσης στα ρυθμιστικά διαλύματα,

— αριθμός πολλαπλών προσδιορισμών.

Αποτελέσματα:

— ενδοεργαστηριακή επαναληπτικότητα και ευαισθησία των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν,

— ανακτήσεις (οι % τιμές για μία έγκυρη μελέτη παρέχονται στο σημείο 1.7.1),

— δεδομένα πολλαπλού προσδιορισμού και μέσοι όροι σε μορφή πινάκων,

— ισοζύγιο μάζας κατά τη διάρκεια και στο τέλος των μελετών (όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη ουσία),

— αποτελέσματα προκαταρκτικής δοκιμής,

— συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων,

— όλα τα αρχικά δεδομένα και αριθμητικά στοιχεία.

Τα ακόλουθα στοιχεία απαιτούνται μόνο όταν έχει προσδιοριστεί η ταχύτητα υδρόλυσης:

— καμπύλες συγκεντρώσεων σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις ελεγχόμενες ουσίες και, κατά περίπτωση, για τα προϊόντα υδρόλυσης σε κάθε τιμή pH και θερμοκρασίας,

— πίνακες αποτελεσμάτων της εξίσωσης του Arrhenius για τη θερμοκρασία 20 °C/25 °C, με pH, ωριαίες ή ημερήσιες σταθερές ταχύτητας [ώρα^{-1} ή ημέρα^{-1}], χρόνο ημίσειας ζωής ή DT50, θερμοκρασίες [°C] συμπεριλαμβανομένων των ορίων εμπιστοσύνης και των συντελεστών συσχέτισης (r^2) ή συγκρίσιμα στοιχεία,

— προτεινόμενη πορεία υδρόλυσης

▼B

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 ºC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) (1995). Οδηγία 95/36/ΕΚ της Επιτροπής για τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου σχετικά με τη διάθεση στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Παράρτημα V: Πορεία και συμπεριφορά στο περιβάλλον.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 — 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

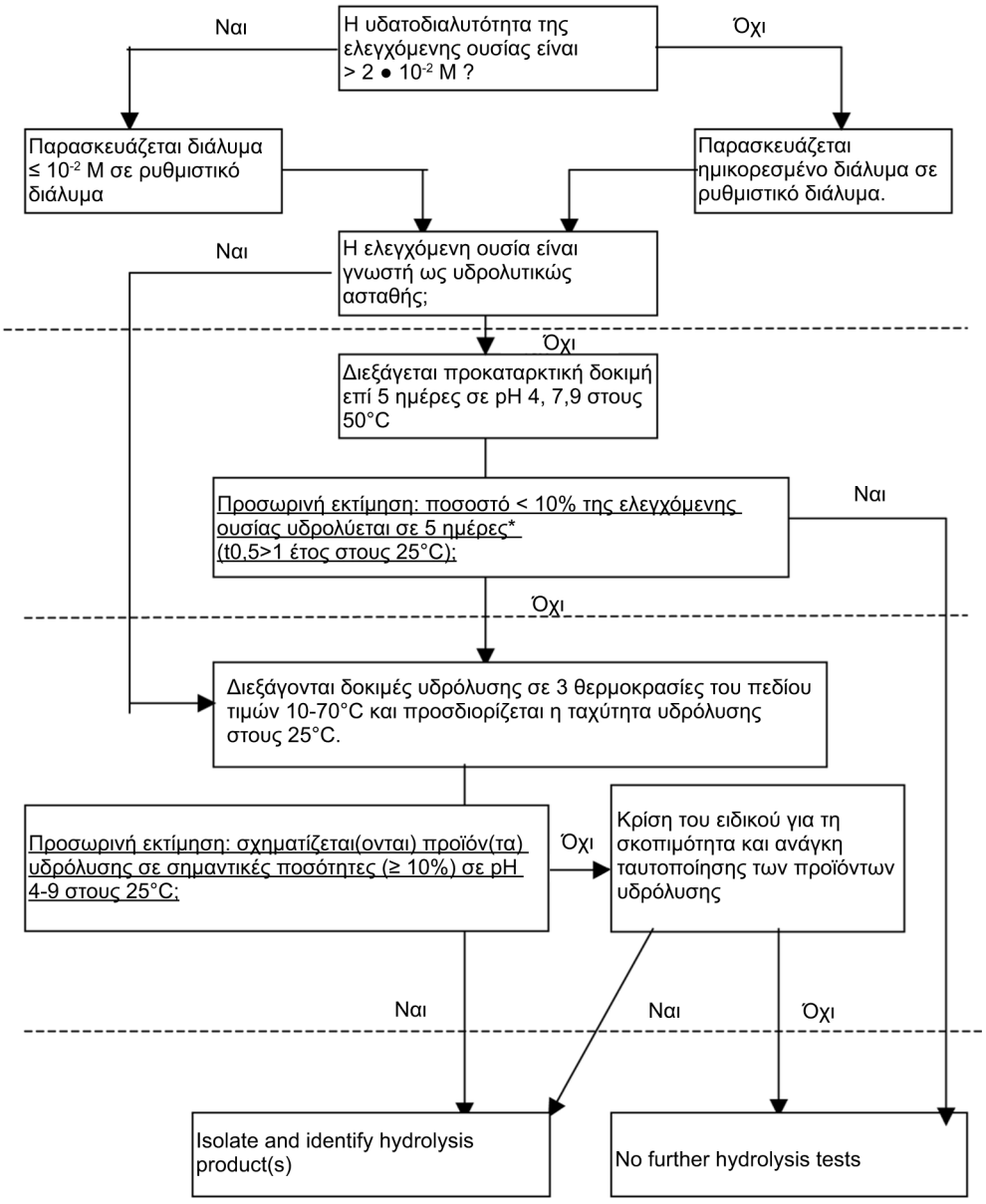
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

Παραρτημα 1

Βαθμιδωτό σύστημα δοκιμών υδρόλυσης



* A vizsgált anyag 10%-os hidrolízise 50 °C-on kb. 30 nap, 25 °C-on kb. 1 év felezési időnek felel meg.Δεν διεξάγονται περαιτέρω δοκιμές υδρόλυσης.

▼B

Παραρτημα 2

Ορισμοί και μονάδες

Πρέπει οπωσδήποτε να χρησιμοποιούνται οι **μονάδες του Διεθνούς Συστήματος (ΔΣ/SI)**.

Ελεγχόμενη ουσία: κάθε ουσία, είτε πρόκειται για τη μητρική ένωση είτε για σημαντικά προϊόντα μετατροπής.

Προϊόντα μετατροπής: κάθε ουσία που προκύπτει από βιοτικές ή αβιοτικές αντιδράσεις μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας.

Προϊόντα υδρόλυσης: κάθε ουσία που προκύπτει από υδρολυτικές αντιδράσεις μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας.

Ωσ υδρόλυση νοείται η αντίδραση ελεγχόμενης ουσίας RX με νερό, όπου πραγματοποιείται καθαρή ανταλλαγή της ομάδας X με OH στο κέντρο της αντίδρασης:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Η ταχύτητα με την οποία μειώνεται η συγκέντρωση της RX στην εν λόγω απλουστευμένη διαδικασία δίδεται από τη σχέση

ταχύτητα = $k\ [H_2O]\ [RX]$ αντίδραση δευτέρας τάξεως

ή

ταχύτητα = $k\ [RX]$ αντίδραση πρώτης τάξεως

ανάλογα με το στάδιο που καθορίζει την ταχύτητα. Επειδή το νερό υπάρχει σε μεγάλη περίσσεια σε σύγκριση με την ελεγχόμενη ουσία, ο εν λόγω τύπος αντίδρασης συνήθως περιγράφεται ως αντίδραση ψευδο-πρώτης τάξεως, όπου η παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας παρέχεται από τη σχέση

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

και μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

όπου

t = χρόνος

και C_o, C_t = συγκεντρώσεις της RX στους χρόνους 0 και t.

Οι μονάδες της σταθεράς αυτής έχουν τις διαστάσεις $(\text{χρόνος})^{-1}$ και ο χρόνος ημίσειας ζωής για την αντίδραση (χρόνος αντίδρασης του 50 % της RX) παρέχεται από τον τύπο

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Χρόνος ημίσειας ζωής: ($t_{0,5}$) είναι ο χρόνος που χρειάζεται προκειμένου να υδρολυθεί το 50 % της ελεγχόμενης ουσίας, όταν η αντίδραση μπορεί να περιγραφεί από κινητική πρώτης τάξεως· είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση.

(*) Εάν η καμπύλη του λογάριθμου των δεδομένων έναντι του χρόνου δεν δηλώνει γραμμική συνάρτηση (εξισούμενη με ταχύτητα αντίδρασης πρώτης τάξεως), τότε η χρήση της εξίσωσης [3] δεν ενδείκνυται για τον υπολογισμό της σταθεράς της ταχύτητας υδρόλυσης της ελεγχόμενης ουσίας.

▼B

DT_{50} [Disappearance Time (Χρόνος Εξαφάνισης) 50]: είναι ο χρόνος εντός του οποίου η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας μειώνεται κατά 50 %· διαφέρει από το χρόνο ημίσειας ζωής $t_{0,5}$ όταν η αντίδραση δεν έχει χαρακτηριστικά κινητικής πρώτης τάξεως.

Υπολογισμός της σταθεράς ταχύτητας k σε διαφορετική θερμοκρασία

Όταν οι σταθερές ταχύτητας είναι γνωστές για δύο θερμοκρασίες, οι σταθερές ταχύτητας σε άλλες θερμοκρασίες μπορούν να υπολογιστούν με τη χρήση της εξίσωσης του Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ ή } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Η καμπύλη ln k έναντι 1/T παρέχει ευθεία γραμμή με κλίση –E/R

όπου:

k = σταθερά ταχύτητας, μετρούμενη σε διαφορετικές θερμοκρασίες

E = ενέργεια ενεργοποίησης [kJ/mol]

T = απόλυτη θερμοκρασία [K]

R = σταθερά των αερίων [8,314 J/mol K]

Η ενέργεια ενεργοποίησης υπολογίστηκε με ανάλυση παλινδρόμησης ή με την ακόλουθη εξίσωση:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

όπου: $T_2 > T_1$.

▼B

Παραρτημα 3

Ρυθμιστικά συστήματα

A. **CLARK ΚΑΙ LUBS:**

Ρυθμιστικά μείγματα των CLARK και LUBS (*)

Σύνθεση	pH
HCl 0,2 N ΚΑΙ KCl 0,2 N ΣΤΟΥΣ 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl και αραίωση μέχρι 100 ml	2,2
Όξινο φθαλικό κάλιο 0,1 M + HCl 0,1 N στους 20 °C	
46,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	2,2
39,60 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	2,4
32,95 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	2,6
26,42 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	2,8
20,32 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	3,0
14,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	3,2
9,90 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	3,4
5,97 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	3,6
2,63 ml HCl 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	3,8
Όξινο φθαλικό κάλιο 0,1 M + NaOH 0,1 N στους 20 °C	
0,40 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	4,0
3,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	4,2
7,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	4,4
12,15 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	4,6
17,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	4,8

(*) Οι τιμές pH που εμφαίνονται στους πίνακες αυτούς υπολογίστηκαν βάσει των μετρήσεων δυναμικού με τη χρήση των πρότυπων εξισώσεων του Sörensen (1909). Οι αντίστοιχες τιμές pH είναι υψηλότερες κατά 0,04 μονάδες από τις τιμές των πινάκων.

▼B

Σύνθεση	pH
23,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	5,0
29,95 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	5,2
35,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	5,4
39,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	5,6
43,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	5,8
45,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φθαλικού άλατος μέχρι 100 ml	6,0

Ρυθμιστικά μείγματα των CLARK και LUBS (συνέχεια)

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο 0,1 M + NaOH 0,1 N στους 20 °C	
5,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	6,0
8,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	6,2
12,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	6,4
17,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	6,6
23,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	6,8
29,63 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	7,0
35,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	7,2
39,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	7,4
42,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	7,6
45,20 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	7,8
46,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml φωσφορικού άλατος μέχρι 100 ml	8,0
H_3B0_3 0,1 M σε KCl 0,1 M + NaOH 0,1 N στους 20 °C	
2,61 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	7,8
3,97 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	8,0
5,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	8,2
8,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	8,4
12,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	8,6
16,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	8,8
21,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	9,0
26,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	9,4
36,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	9,6
40,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	9,8
43,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml βορικού οξέος μέχρι 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF KAI VLEESCHHOUWER:**

Ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού άλατος των KOLTHOFF και VLEESCHHOUWER

Σύνθεση	pH
Δισόξινο κιτρικό κάλιο 0,1 M και HC1 0,1 N στους 18 ºC (*)	
49,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	2,2
43,4 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	2,4
36,8 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	2,6
30,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	2,8
23,6 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	3,0
17,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	3,2
10,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	3,4
4,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	3,6
Δισόξινο κιτρικό κάλιο 0,1 M και NaOH 0,1 N στους 18 ºC (*)	
2,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	3,8
9,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	4,0
16,3 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	4,2
23,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	4,4
31,5 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	4,6
39,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	4,8
46,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	5,0
54,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	5,2
61,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	5,4
68,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	5,6
74,4 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	5,8
81,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml κιτρικού άλατος μέχρι 100 ml	6,0

(*) Προστίθεται μικροσκοπικός κρύσταλλος θυμόλης ή ανάλογη ουσία ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη μυκήτων.

▼B

Γ. **SÖRENSEN:**

Μείγματα βορικού άλατος του SÖRENSEN

Σύνθεση		Sörensen 18 °C	Walbum, pH στους		
ml βόρακα	ml HCl/NaO H		10 °C	40 °C	70 °C
Βόρακας 0,05 M + HCl 0,1 N					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
Βόρακας 0,05 M + NaOH 0,1 N					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Μείγματα φωσφορικών αλάτων του SÖRENSEN

Σύνθεση	pH
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο 0,0667 M + Όξινο φωσφορικό νάτριο 0,0667 M στους 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml, KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml, KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

Γ.8 **ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΠΑ ΤΟΥΣ ΓΑΙΟΣΚΩΛΗΚΕΣ:**

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΤΕΧΝΗΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην εργαστηριακή αυτή δοκιμασία, η ελεγχόμενη ουσία προστίθεται σε τεχνητό έδαφος στο οποίο τοποθετούνται γαιοσκώληκες για 14 ημέρες. Μετά την περίοδο αυτή (και προαιρετικά μετά από επτά ημέρες) εξετάζεται η θανατηφόρος δράση της ουσίας στους γαιοσκώληκες, Η δοκιμασία παρέχει μέθοδο για τη σχετικά βραχυπρόθεσμη παρακολούθηση της δράσης χημικών ουσιών στους γαιοσκώληκες, με πρόσληψη από το δέρμα ή την τροφική οδό.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΑ

LC_{50}: Η συγκέντρωση μιας ουσίας που υπολογίζεται ότι σκοτώνει το 50 % των πειραματοζώων κατά την περίοδο της δοκιμασίας.

1.3. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Χρησιμοποιείται περιοδικά μια ουσία αναφοράς για να επιβεβαιώνεται ότι η ευαισθησία του συστήματος ελέγχού δεν έχει μεταβληθεί σημαντικά.

Ως ουσία αναφοράς συνιστάται το χλωροακεταμίδιο αναλυτικής καθαρότητας.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Το έδαφος είναι μεταβλητό μέσο, ώστε στη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιείται τεχνητό αργιλώδες έδαφος που έχει καθοριστεί με προσοχή. Ενήλικες γαιοσκώληκες του είδους Eisenia foetida (βλέπε σημείωση στο προσάρτημα) διατηρούνται σε καθορισμένο τεχνητό έδαφος που έχει υποστεί κατεργασία με διαφορετικές σνγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Το περιεχόμενο των δοχείων απλώνεται σε δίσκο 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμασίας και μετριούνται οι γαιοσκώληκες που έχουν επιζήσει σε κάθε συγκέντρωση.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Η δοκιμασία έχει μελετηθεί για να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δυνατή αναπαραγωγιμότητα σε σχέση με το υπόστρωμα και τον οργανισμό ελέγχου. Η θνησιμότητα των μαρτύρων στο τέλος της δοκιμασίας δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 %, διαφορετικά η δοκιμασία είναι άκυρη.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

1.6.1. *Υλικά*

1.6.1.1. Υπόστρωμα δοκιμασίας

Ως βασικό υπόστρωμα για τη δοκιμασία χρησιμοποιείται καθορισμένο τεχνητό έδαφος,

α) Βασικό υπόστρωμα (τα ποσοστά εκφράζουν ξηρό βάρος)

— 10 % τύρφη σφάγνων (με pH όσο το δυνατό πλησιέστερα στο 5,5-6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτού και λεπτά αλεσμένη),

▼B

— 20 % άργιλος καολινίτη, κατά προτίμηση με περισσότερο από 50 % καολινίτη,

— 69 % περίπου βιομηχανική χαλαζιακή άμμος (να υπερισχύει η λεπτή άμμος με ποσοστό περισσότερο από 50 % σε μέγεθος σωματιδίων 0,05 έως 0,2 mm). Αν η ουσία δεν διασπείρεται αρκετά στο νερό, φυλάσσονται 10 g ανά δοχείο δοκιμασίας για να αναμειχθούν αργότερα με τη δοκιμαζόμενη ουσία.

— 1 % περίπου ανθρακικό ασβέστιο ($CaC0_3$), κονιοποιημένο, χημικά καθαρό, που προστίθεται για να ρυθμιστεί το pH στο 6,0 ± 0,5.

β) Υπόστρωμα δοκιμασίας

Το υπόστρωμα δοκιμασίας περιέχει το βασικό υπόστρωμα, την ελεγχόμενη ουσία και απιονισμένο νερό.

Η περιεκτικότητα σε νερό είναι περίπου 25 έως 42 % του ξηρού βάρους του βασικού υποστρώματος και προσδιορίζεται με ξήρανση ενός δείγματος στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους. Το κριτήριο-κλειδί είναι ότι το τεχνητό έδαφος πρέπει να υγρανθεί τόσο ώστε να μην υπάρχει στάσιμο νερό. Η ανάμειξη γίνεται με προσοχή για να ληφθεί ομοιόμορφη κατανομή της δοκιμαζόμενης ουσίας στο υπόστρωμα. Ο τρόπος ενσωμάτωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας στο υπόστρωμα πρέπει να αναφέρεται.

γ) Υπόστρωμα-μάρτυρας

Το υπόστρωμα-μάρτυρας περιέχει το βασικό υπόστρωμα και νερό. Αν χρησιμοποιούνται πρόσθετα, παρασκευάζεται συμπληρωματικός μάρτυρας που περιέχει την ίδια ποσότητα προσθέτου.

1.6.1.2. Δοχεία δοκιμασίας

Είναι γυάλινα δοχεία χωρητικότητας ενός λίτρου περίπου (κατάλληλα σκεπασμένα με πλαστικά καλύμματα, πλάκες ή με πλαστική μεμβράνη με οπές αερισμού), γεμάτα με μια ποσότητα υγρού υποστρώματος ελέγχου ή μάρτυρα που ισοδυναμεί με 500 g ξηρού βάρους υποστρώματος.

1.6.2. *Συνθήκες δοκιμασίας*

Τα δοχεία διατηρούνται σε κλιματιζόμενους θαλάμους σε θερμοκρασία 20 ± 2 °C με συνεχές φως. Η ένταση του φωτός θα πρέπει να είναι 400 έως 800 lux.

Η περίοδος δοκιμασίας είναι 14 ημέρες αλλά η θνησιμότητα μπορεί να υπολογιστεί προαιρετικά επτά ημέρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας.

1.6.3. *Διαδικασία δοκιμασίας*

Συγκεντρώσεις δοκιμασίας

Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας εκφράζονται ως βάρος της ουσίας ανά ξηρό βάρος του βασικού υποστρώματος (mg/kg).

Δοκιμασία προσδιορισμού σειράς

Η σειρά των συγκεντρώσεων που προξενούν θνησιμότητα από 0 μέχρι 100 % μπορεί να βρεθεί με δοκιμασία προσδιορισμού σειράς ώστε να συγκεντρωθούν πληροφορίες για τη σειρά συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στην οριστική δοκιμασία.

▼B

Οι ουσίες ελέγχονται στις εξής συγκεντρώσεις: 1 000, 100, 10, 1 και 0,1 mg ουσίας/kg υποστρώματος ελέγχου (ξηρό βάρος).

Αν πρόκειται να διεξαχθεί πλήρης οριστική δοκιμασία, ένας κύκλος δοκιμασίας ανά συγκέντρωση και ένας για τον μάρτυρα που δεν έχει υποστεί κατεργασία, καθένας με δέκα σκώληκες, επαρκούν για τη δοκιμασία προσδιορισμού σειράς.

Οριστική δοκιμασία

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας προσδιορισμού σειράς χρησιμοποιούνται για την εκλογή πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεων σε γεωμετρική σειρά που να καλύπτουν ακριβώς την κλίμακα θνησιμότητας 0 έως 100 % και να διαφέρουν κατά σταθερό συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 1,8.

Η δοκιμασία που εκτελείται με αυτές τις σειρές συγκεντρώσεων επιτρέπει να προσδιοριστούν με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια η τιμή LC_{50} και τα όρια εμπιστοσύνης γι' αυτήν.

Στην οριστική δοκιμασία διεξάγονται τέσσερις τουλάχιστον κύκλοι ελέγχου ανά συγκέντρωση και τέσσερις για τους μάρτυρες που δεν έχουν υποστεί κατεργασία, καθένας με δέκα σκώληκες. Το αποτέλεσμα αυτών των σειρών δοκιμών εκφράζονται ως μέσος όρος και τυπική απόκλιση.

Όταν δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις με λόγο 1,8 προκαλούν θνησιμότητα μόνο 0 % και 100 %, οι δύο αυτές τιμές είναι αρκετές για να δειχθεί η περιοχή τιμών μέσα στην οποία βρίσκεται η τιμή της LC_{50}.

Ανάμειξη του βασικού υποστρώματος δοκιμασίας και της δοκιμαζόμενης ουσίας

Το υπόστρωμα δοκιμασίας θα πρέπει, κατά το δυνατό, να παρασκευάζεται χωρίς άλλα πρόσθετα μέσα εκτός από νερό. Αμέσως πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, ένα γαλάκτωμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης ουσίας σε απιονισμένο νερό ή άλλο διαλύτη αναμειγνύεται με το βασικό υπόστρωμα δοκιμασίας ή ψεκάζεται ομοιόμορφα πάνω από αυτό με λεπτό χρωματογραφικό ή παρόμοιο ψεκαστήρα,

Αν η ελεγχόμενη συσία δεν διαλύεται στο νερό, είναι δυνατόν να διαλυθεί σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο κατάλληλου οργανικού διαλύτη (π.χ. εξάνιο, ακετόνη ή χλωροφόρμιο).

Μόνο μέσα που εξαερώνονται εύκολα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαλυτοποίηση, διασπορά ή γαλακτωματοποίηση της ελεγχόμενης ουσίας. Το υπόστρωμα ελέγχου πρέπει να αερίζεται πριν χρησιμοποιηθεί. Η ποσότητα νερού που εξατμίζεται πρέπει να αναπληρώνεται. Ο μάρτυρας περιέχει την ίδια ποσότητα από οποιαδήποτε πρόσθετο.

Αν η δοκιμαζόμενη ουσία δεν διαλύεται, διασπείρεται ή γαλακτωματοποιείται σε οργανικούς διαλύτες, 10 g ενός μείγματος από λεπτή κονιοποιημένη χαλαζιακή άμμο και την ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας που απαιτείται για την κατεργασία 500 g ξηρού βάρους τεχνητού εδάφους, αναμειγνύονται με 490 g ξηρού βάρους υποστρώματος δοκιμασίας.

Για κάθε κύκλο δοκιμασίας, ποσότητα υγρού υποστρώματος δοκιμασίας που ισοδυναμεί με 500 g ξηρού βάρους τοποθετείται σε κάθε γυάλινο δοχείο. Δέκα γαιοσκώληκες, που έχουν προκαλλιεργηθεί για 24 ώρες σε παρόμοιο υγρό βασικό υπόστρωμα, στη συνέχεια έχουν πλυθεί και η περίσσεια του νερού έχει απορροφηθεί με διηθητικό χαρτί πριν χρησιμοποιηθούν, τοποθετούνται στην επιφάνεια του υποστρώματος δοκιμασίας.

▼B

Τα δοχεία καλύπτονται με διάτρητα πλαστικά καλύμματα, πλάκες ή μεμβράνη για να μην ξηρανθεί το υπόστρωμα και διατηρούνται στις συνθήκες της δοκιμασίας για 14 ημέρες.

Οι εκτιμήσεις γίνονται 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμασίας. Το υπόστρωμα απλώνεται σε δίσκο κατασκευασμένο από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα, Εξετάζονται οι γαιοσκώληκες και προσδιορίζεται ο αριθμός αυτών που επιζούν. Οι γαιοσκώληκες θεωρούνται νεκροί αν δεν αντιδρούν σε ελαφρό μηχανικό ερεθισμό στο πρόσθιο άκρο τους.

Όταν η εξέταση γίνεται μετά από επτά ημέρες, το δοχείο γεμίζεται πάλι με το υπόστρωμα και οι επιζώντες γαιοσκώληκες επανατοποθετούνται στην επιφάνεια του ίδιου υποστρώματος ελέγχου.

1.6.4. *Οργανισμοί δοκιμασίας*

Οι οργανισμοί δοκιμασίας θα πρέπει να είναι ενήλικες Eisenia foetida (βλέπε σημείωση στο προσάρτημα) (ηλικίας τουλάχιστον δύο μηνών, με δακτυλιοειδή τμήματα) υγρού βάρους 300 έως 600 mg. (Για μέθοδο εκτροφής βλέπε προσάρτημα.)

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας αναφέρονται σε συσχετισμό με τα αντίστοιχα ποσοστά νεκρών γαιοσκωλήκων.

Όταν τα δεδομένα είναι *αρκετά,* η τιμή LC_{50} και τα όρια εμπιστοσύνης (p = 0,05) προσδιορίζονται με πρότυπες μεθόδους (Litchfield και Wilcoxon, 1949, ή αντίστοιχη μέθοδο). Η τιμή LC_{50} δίνεται ως mg της ελεγχόμενης ουσίας ανά kg υποστρώματος ελέγχου (ξηρό βάρος).

Σε περίπτωση που η κλίση της καμπύλης συγκεντρώσεων είναι πολύ μεγάλη και δεν επιτρέπει τον υπολογισμό της LC_{50}, αρκεί ο γραφικός υπολογισμός της τιμής αυτής.

Όταν δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις με λόγο 1,8 προσκαλούν θνησιμότητα μόνο 0 % και 100 %, οι δύο αυτές τιμές είναι αρκετές για να δειχθεί η περιοχή τιμών μέσα στην οποία βρίσκεται η τιμή της LC_{50}.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση της δοκιμασίας περιλαμβάνει, αν είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες:

— δήλωση ότι η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα παραπάνω ποιοτικά κριτήρια,

— τη δοκιμασία που πραγματοποιήθηκε (δοκιμασία προσδιορισμού σειράς ή/και οριστική δοκιμασία),

— ακριβή περιγραφή των συνθηκών της δοκιμασίας ή δήλωση ότι η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο· οποιεσδήποτε παρεκκλίσεις πρέπει να αναφέρονται,

— ακριβή περιγραφή του τρόπου με τον οποίο η δοκιμαζόμενη ουσία αναμείχθηκε με το βασικό υπόστρωμα δοκιμασίας,

— πληροφορίες για τους οργανισμούς δοκιμασίας (είδος, ηλικία, μέσος όρος και κλίμακα βάρους, συνθήκες διατήρησης και αναπαραγωγής, προμηθευτής),

▼B

— τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της LC_{50},

— τα αποτελέσματα της δοκιμασίας, συμπεριλαμβανομένων όλων των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν,

— περιγραφή συμπτωμάτων ή αλλαγών συμπεριφοράς που παρατηρήθηκαν στους οργανισμούς των μαρτύρων,

— τη θνησιμότητα των μαρτύρων,

— την τιμή LC_{50} ή την υψηλότερη συγκέντρωση ελέγχου που δεν προκάλεσε θνησιμότητα και τη χαμηλότερη συγκέντρωση που προκάλεσε θνησιμότητα 100 %, 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμάσιας,

— γραφική παράσταση της καμπύλης συγκέντρωσης/απόκρισης,

— τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με την ουσία αναφοράς, είτε στα πλαίσια της δοκιμασίας αυτής είτε από προηγούμενα πειράματα ποιοτικού ελέγχου.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(I) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 207,* απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms.* Chapman and Hall, London, 331 pp.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systématique,* Institut national dc la recherche agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose effect experiments. J. of Pharm. and Exp. Therap., 1, vol. 96, 1949, p. 99.

(5) Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms,* έκθεση EUR 8714 EN, 1983,

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje, Ö*kotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Προσάρτημα

Αναπαραγωγή και διατήρηση των σκωλήκων πριν από τη δοκιμασία

Για την αναπαραγωγή οργανισμών, 30 έως 50 ενήλικες σκώληκες τοποθετούνται σε δοχείο αναπαραγωγής με φρέσκο υπόστρωμα και μεταφέρονται μετά από 14 ημέρες. Οι οργανισμοί αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για νέους κύκλους αναπαραγωγής. Οι γαιοσκώληκες που εκκολάπτονται από τους βόμβυκες χρησιμοποιούνται για τη δοκιμασία αφού ωριμάσουν (στις συνθήκες που καθορίζονται, μετά από δύο έως τρεις μήνες).

Συνθήκες διατήρησης και αναπαραγωγής

Κλιματιζόμενος θάλαμος:	θερμοκρασία 20 ± 2 °C, κατά προτίμηση με συνεχές φως (ένταση 400 έως 800 lux).
Δοχεία αναπαραγωγής:	κατάλληλα ρηχά δοχεία με όγκο 10 έως 20 l.
Υπόστρωμα:	Οι οργανισμοί *Eisenia foetida* μπορούν να αναπαραχθούν σε διάφορα ζωικά περιττώμα-τα. Συνιστάται η χρήση ενός μείγματος από 50 % κατ' όγκο τύρφη και 50 % κοπριά αγελάδας ή αλόγου σαν υλικού αναπαραγωγής, Το υλικό θα πρέπει να έχει pH 6 έως 7 περίπου (ρυθμίζεται με ανθρακικό ασβέστιο) και χαμηλή ιονική αγωγιμότητα (λιγότερο από 6 mm hos ή 0,5 % συγκέντρωση αλάτων) Το υπόστρωμα θα πρέπει να είναι υγρό αλλά όχι πολύ βρεγμένο. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και άλλες επιτυχείς μέθοδοι.

Σημείωση: Οι γαιοσκώληκες *Eisenia foetida* απαντούν σε δύο οικογένειες, τις οποίες ορισμένοι ειδικοί στην ταξινόμηση έχουν διαχωρίσει σε είδη (Bouche, 1972). Οι δύο οικογένειες είναι παρόμοιες μορφολογικά αλλά η μία, *Eisenia foetida foetida*, παρουσιάζει τυπικές εγκάρσιες ζώνες ή λωρίδες στα μεταμερίδια ενώ η άλλη. *Eisenia foetida* andrei, δεν τις έχει και είναι ποικιλόχρωμη με κοκκινωπή απόχρωση. Αν είναι δυνατόν, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ή *Eisenia foetida* andrei. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη αν είναι γνωστή η αναγκαία μεθοδολογία.

▼B

Γ.9 **ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ**

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ZAHN-WELLENS

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος αποβλέπει στην εκτίμηση της δυνητική τελικής βιοαποικοδομητικότητας υδατοδιαλυτών, μη πτητικών οργανικών ουσιών, όταν αυτές εκτίθενται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών σε στατιστική δοκιμασία.

Στα εν αιωρήσει στερεά, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί φυσικοχημική προσρόφηση και αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (βλέπε σημείο 3.2.).

Οι υπό μελέτη ουσιές χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις που αντιστοιζούν σε τιμές DOC μεταξύ 50 και 400 mg/l ή τιμές COD μεταξύ 100 και 1 000 mg/l (DOC = dissolved organic carbon/διαλελυμένος οργανικός άνθρακας· COD = chemical oxygen demand/χημική απαίτηση σε οξυγόνο). Οι σχετικές υψηλές αυτές συγκεντρώσεις παρουσιάζουν το πλεονέκτημα της αναλυτικής αξιοπιστίας. Ενώσεις με τοξικές ιδιότητες μπορούν να επιβραδύνουν ή να αναστείλουν τη διαδικασία αποικοδομήσεως,

Στη μέθοδο αυτή, η μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα ή της χημικής απαίτησης σε οξυγόνο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της τελικής βιοαποικοδόμηση ς της ουσίας που υποβάλλεται στη δοκιμασία.

Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου μπορεί να επιτρέψει τον προσδιορισμό της πρωτογενούς βιοαποικοδόμησης της ουσίας (εξαφάνιση της αρχικής χημικής δομής).

Η μέθοδος εφαρμόζεται αποκλειστικά στις υπό δοκιμασία οργανικές ουσίες εφόσον, στη συγκέντρωση υπό την οποία χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία:

— είναι υδατοδιαλυτές στις συνθήκες υπό τις οποίες διεξάγεται η δοκιμασία,

— η τάση των ατμών τους στις συνθήκες υπό τις οποίες διεξάγεται η δοκιμασία είναι αμελητέα,

— δεν αποτελούν αντιβακτηριακούς παράγοντες,

— η προσρόφησή τους στο σύστημα της δοκιμασίας είναι περιορισμένη,

— δεν χάνονται από το διάλυμα της δοκιμασίας λόγω του σχηματισμού αφρού.

Στοιχεία που αφορούν τη σχετική αναλογία των κυριότερων συστατικών του υπό δοκιμασία υλικού θα είναι χρήσιμα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδίως στις περιπτώσεις όπου οι τιμές των αποτελεσμάτων είναι μικρές ή οριακές.

Είναι σκόπιμο να γνωστοποιούνται τα στοιχεία που αφορούν την τοξικότητα της ουσίας σε μικροοργανισμούς προκειμένου να χρησιμοποιούνται στην ερμηνεία των χαμηλών τψών των αποτελεσμάτων και στην επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων για τη δοκιμασία.

▼B

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Ο βαθμός αποικοδόμησης που λαμβάνεται στο τέλος της δοκιμασίας αναφέρεται ως «Βισαποικοδομητικότητα στην δοκιμασία Zahn-Wellens»

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

όπου:

D_T = βιοαποικσδόμηση (%) σε χρόνο T,

C_A = τιμές DOC (ή COD) στο μείγμα τις δοκιμασίας, η μέτρηση των οποίων έχει γίνει τρεις ώρες μετά από την έναρξη της δοκιμασίας (mg/l) (DOC = dissolved organic carbon/διαλελυμένος οργανικός άνδρακας· COD = chemical oxygen demand/χημική απαίτηση σε οξυγόνο),

C_T = τιμές DOC ή COD στο μείγμα της δοκιμασίας, τη στιγμή της δειγματοληψίας (mg/l),

C_B = τιμή DOC ή COD της τυφλής δοκιμασίας τη στιγμή της δειγματοληψίας (mg/l),

C_{BA} = τιμή DOC ή COD της τυφλής δοκιμασίας, η μέτρηση της οποίας έχει γίνει τρεις ώρες μετά από την έναρξη

της δοκιμασίας (mg/l).

Ο αριθμός που εκφράζει το ύψος της αποικοδόμησης στρογγυλεύεται στην πλησιέστερη ακέραια εκατοστιαία μονάδα. Η εκατοστιαία αποικοδόμηση εκφράζεται σε επί τους εκατό DOC (ή COD) απώλεια της υπό δοκιμασία ουσίας.

Η διαφορά μεταξύ της τιμής που μετρήθηκε μετά από τρεις ώρες και της αρχικής τιμής που έχει υπολογιστεί —ή καλύτερα μετρηθεί— μπορεί να παράσχει χρήσιμα στοιχεία για την αποικοδόμηση της ουσίας (βλέπε σημείο 3.2 «Ερμηνεία των αποτελεσμάτων»).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Σε μερικές περιπτώσεις ανάλυσης νέων ουσιών είναι χρήσιμη η παρουσία ουσιών αναφοράς. Ωστόσο δεν είναι ακόμη δυνατόν να διατυπωθούν συστάσεις για συγκεκριμένης ουσίες αναφοράς.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Οι ενεργοποιημένες ιλύες, τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά και το υλικό της δοκιμασίας σε υδατικό διάλυμα ως αποκλειστική πηγή άνθρακα τοποθετούνται μαζί σε υάλινο δοχείο χωρητικότητας 1 έως 4 λίτρων, το οποίο φέρει αναδευτήρα και συσκευή για την εισπίεση αέρα. Αναδεύεται το μείγμα και διοχετεύεται αέρας σε 20 έως 25 °C, υπό διάχυτο φωτισμό ή σε σκοτεινό θάλαμο επί 28 ημέρες κατά μέγιστο όριο. Η διαδικασία αποικοδόμησης παρακολουθείται προσδιορίζοντας τις τιμές DOC (ή COD) στο διηθηθέν διάλυμα, καθημερινά ή ανά τακτά διαστήματα. Η αναλογία του αποικοδομούμενου DOC (ή COD), μετά από κάθε ανάπαυλα, προς την τιμή της μέτρησης που διενεργείται τρεις ώρες μετά από την έναρξη εκφράζεται ως ποσοστό βιοαποικοδόμησης και χρησιμεύει ως μέτρο του βαθμού αποικοδομήσεως τη στιγμή εκείνη. Η σημείωση των αποτελεσμάτων αυτών σε σύστημα συντεταγμένων σε συνάρτηση με τον παράγοντα χρόνος παρέχει την καμπύλη βιοαποικοδόμησης.

Όταν χρησιμοποιείται μια ειδική αναλυτική μέθοδος είναι δυνατόν να μετρηθούν οι μεταβολές της συγκέντρωσης της αρχικής ένωσης, οι οποίες οφείλονται στη βιοαποικοδόμηση (πρωτογενής βιοαποικοδόμηση).

▼B

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Σε ένα ring test αποδείχτηκε η αναπαραγωγιμότητα ικανοποιητική.

Η ευαισθησία της μεθόδου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το βαθμό σταθερότητας της τυφλής δοκιμασίας και σε μικρότερο βαθμό από την ακρίβεια του προσδιορισμού του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα και το επίπεδο της ενώσεως της δοκιμασίας στο υγρό.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

1.6.1. *Προπαρασκευαστικές εργασίες*

1.6.1.1. Αντιδραστήρια

Νερό που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία; πόσιμο νερό με περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα μικρότερη των 5 mg/l. Η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου μαζί δεν πρέπει να υπερβαίνει το επίπεδο των 2,7 mmole/l. Στην περίπτωση που δεν τηρηθεί το όριο αυτό απαιτείται αραίωση με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.

Θειικό οξύ αναλυτικού βαθμού καθαρότητας:	50 g/l.
Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας:	40 g/l.
Ανόργανο θρεπτικό διάλυμα: διαλύονται σε ένα λίτρο απιονισμένου νερού:	
χλωριούχο αμμώνιο, NH_4CL, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας:	38,5 g,
δισόξινο φωσφορικό νάτριο, $N_4H_2PO_4.2H_2^O$, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας:	33,4 g,
δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας:	8,5 g,
μονόξινο φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας:	21,75 g.

Το μείγμα χρησιμεύει τόσο ως θρεπτικό όσο και ως ρυθμιστικό διάλυμα.

1.6.1.2. Όργανα

Υάλινα δοχεία χωρητικότητας 1 έως 4 λίτρων (π.χ. κυλινδρικά δοχεία).

Αναδευτήρας με υάλινο ή μεταλλικό βραχίονα αναδεύσεως σε κατάλληλο στέλεχος (ο βραχίονας πρέπει να περιστρέφεται σε ύψος 5 έως 10 cm περίπου από τον πυθμένα του δοχείου). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά μαγνητικός αναδευτήρας μήκους 7 έως 10 cm.

Υάλινος σωλήνας εσωτερικής διαμέτρου 2 έως 4 mm για την εισαγωγή αέρα. Το στόμιο του σωλήνα πρέπει να είναι σε ύψος 1 cm περίπου από τον πυθμένα του δοχείου.

Συσκευή φυγοκεντρήσεως (περίπου 3 550 g). pH-μέτρο.

Μετρητής του διαλελυμένου οξυγόνου.

Χάρτινοι ηθμοί.

▼B

Συσκευή διηθήσεως με μεμβράνη.

Μεμβράνες διηθήσεως, μεγέθους πόρου 0,45 μm. Οι μεμβράνες διηθήσεως είναι κατάλληλες εφόσον αποδεδειγμένα· δεν αποδεσμεύουν άνθρακα ούτε απορροφούν την ουσία κατά το στάδιο της διηθήσεως.

Αναλυτικός εξοπλισμός για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου οργανικού άνθρακα και της χημικής απαίτησης σε

οξυγόνο.

1.6.1.3. Παρασκευή του εμβολίου

Η ενεργοποιημένη ιλύς που λαμβάνεται από σταθμό βιολογικής κατεργασίας εκπλύσεται με τη βοήθεια (επανειλημμένων) φυγόκεντρησεων ή καθιζήσεως με νερό κατάλληλο για τη δοκιμασία (ανωτέρω).

Η ενεργοποιημένη ιλύς πρέπει να είναι σε κατάλληλη κατάσταση. Τέτοια ιλύς μπορεί να ληφθεί από ένα σταθμό επεξεργασίας λυμάτων που λειτουργεί κανονικά. Προκειμένου η ποικιλία των βακτηριακών ειδών ή στελεχών να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερη, ίσως είναι προτιμότερο να αναμειγνύονται υλικά ενοφθαλμισμού διαφορετικής προελεύσεως (π.χ. από διαφορετικούς σταθμούς κατεργασίας, δείγματα εδάφους, ποτάμια νερά κλπ.). Το μείγμα υφίσταται επεξεργασία όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Για τον έλεγχο της δραστικότητας της ενεργοποιημένης ιλύος βλέπε «Λειτουργικός έλεγχος» παρακάτω.

1.6.1.4. Παρασκευή των διαλυμάτων της δοκιμασίας

Στο δοχείο της δοκιμασίας προστίθενται 500 ml κατάλληλου για τη δοκιμασία νερού, 2,5 ml/1 ανόργανου θρεπτικού διαλύματος και ενεργοποιημένη ιλύς σε τιμή που αντιστοιχεί σε 0,2 έως 1,0 g/l ξηρής ύλης στο τελικό μείγμα. Προστίθεται επαρκώ; ποσότης αποθέματος διαλύματος της υπό δοκιμασία ουσίας μέχρις ότου επιτευχθεί στο τελικό μείγμα συγκέντρωση DOC 50 έωζ 4O0 mg/l. Οι αντίστοιχες τιμές COD είναι 100 έως 1 000 mg/l. Προστίθεται κατάλληλο για τη δοκιμασία νερό μέχρι τελικού συνολικού όγκου 1 έως 4 λίτρων. Ο καθορισμός του τελικού όγκου εξαρτάται από τον αριθμό των δειγμάτων που λαμβάνονται για προσδιορισμό του DOC ή του COD, καθώς και από τους όγκους που είναι αναγκαίοι για τη διεξαγωγή της ανάλυσης. Συνήθως ένας όγκος δύο λίτρων μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητικός.

Σε κάθε σειρά δοκιμασιών ακολουθείται παράλληλη διαδικασία για ένα τουλάχιστον δοχείο-μάρτυρα (τυφλή δοκιμασία). Το δοχείο αυτό περιέχει αποκλειστικά ενεργοποιημένη ιλύ και ανόγρανο θρεπτικό διάλυμα, όπου προστίθεται κατάλληλο για τη δοκιμασία νερό μέχρι συνολικού όγκου ισοδύναμου με αυτόν των δοχείων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία.

1.6.2. *Διεξαγωγή της δοκιμασίας*

Το περιεχόμενο των δοχείων της δοκιμασίας αναδεύεται με μαγνητικούς αναδευτήρες ή έλικες υπό συνθήκες διάχυτου φωτισμού ή σε σκοτεινό θάλαμο σε θερμοκρασία 20 έως 25 °C. Ο αερισμός εξασφαλίζεται με τη διοχέτευση αέρα υπό πίεση ο οποίος καθαρίζεται με ηθμό από βαμβάκι ή και με φιάλη εκπλύσεως, εφόσον αυτό είναι αναγκαίο. Πρέπει να εξασφαλιστεί ότι η ιλύς δεν θα καθιζάνει και ότι η συγκέντρωση του οξυγόνου δεν θα πέσει σε επίπεδα χαμηλότερα των 2 mg/l.

Η τιμή του pH πρέπει να ελέγχεται τακτικά (π.χ. καθημερινά) και εφόσον αυτό είναι αναγκαίο να διορθώνεται σε pH 7 έως 8.

▼B

Οι απώλειες από την εξάτμηση αναπληρώνονται πριν από κάθε δειγματοληψία με τις απαιτούμενες ποσότητες απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Μια καλή μέθοδος είναι να σημειώνεται η στάθμη του υγρού στο δοχείο πριν από την έναρξη της δοκιμασίας. Μετά από κάθε δειγματοληψία σημειώνεται η νέα στάθμη (χωρίς αερισμό και ανάδευση), Τα πρώτα δείγματα λαμβάνονται πάντοτε τρεις ώρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας προκειμένου να εντοπισθεί η προσρόφηση υλικού της δοκιμασίας από την ενεργοποιημένη ιλύ.

Η εξάλειψη του υλικού της δοκιμασίας απολουθείται από προσδιορισμούς DOC ή COD που διεξάγονται σε καθημερινή ή σε κάποια άλλη τακτική βάση. Τα δείγματα από το δοχείο της δοκιμασίας και από αυτό της τυφλής δοκιμασίας διηθούνται με τη βοήθεια προσεκτικά εκπλυθέντος χάρτινου ηθμού. Τα πρώτα 5 ml του διαλύμα-τος-διηθήματος της δοκιμασίας απομακρύνονται. Οι ιλύες που είναι δύσκολο να διηθηθούν μπορούν να αφαιρεθούν προηγουμένως διά φυγοκεντρήσεως επί 10 λεπτά. Οι προσδιορισμοί DOC και COD πραγματοποιούνται τουλάχιστον εις διπλούν. Η δοκιμασία διεξάγεται επό 28 ημέρες κατά μέγιστο όριο.

Σημείωση: Τα δείγματα που παραμένουν θολά διηθούνται με τη βοήθεια ηθμών από μεμβράνη. Οι ηθμοί από μεμβράνη πρέπει να μην αποδεσμεύουν ή προσροφούν οργανικές ύλες.

Λειτουργικός έλεγχος της ενεργοποιημένης ιλύος

Παράλληλα με κάθε σειρά δοκιμασιών πρέπει να διεξάγεται και μια δοκιμασία με δοχείο που περιέχει γνωστή ουσία, προκειμένου να ελέγχεται η λειτουργική αποδοτικότητα της ενεργοποιημένης ιλύος. Η διαιθυλενογλυκόλη έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμη για το σκοπό αυτό.

Προσαρμογή των μικροοργανισμών

Εφόσον τα χρονικά διαστήματα που μεσολαβούν μεταξύ των αναλύσεων είναι σχετικά μικρά (π.χ, εφόσον διεξάγονται καθημερινά), η προσαρμογή των μικροοργανισμών μπορεί να αναγνωριστεί σαφώς από την καμπύλη αποικοδομήσεως (βλέπε σχήμα 2). Κατά συνέπεια η δοκιμασία δεν πρέπει να αρχίζει αμέσως πριν το Σαββατοκύριακο.

Στην περίπτωση που η προσαρμογή πραγματοποιείται στο τέλος της περιόδου, η δοκιμασία μπορεί να παραταθεί μέχρις ότου περατωθεί η διάσπαση.

Σημείωση: Εφόσον απαιτείται ευρύτερη γνώση της συμπεριφοράς της ιλύος, η ίδια ενεργοποιημένη ιλύς εκτίθεται για άλλη μια φορά στο ίδιο υλικό της δοκιμασίας, σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

Σταματάμε τη λειτουργία του αναδευτήρα και της συσκευής για την εισπίεση αέρα και αφήνουμε την ενεργοποιημένη· ιλύ σε ηρεμία ώστε να καθιζάνει. Απομακρύνουμε το επιπλέον υγρό, προσθέτουμε νερό της δοκιμασίας μέχρι τελικού όγκου δύο λίτρων, αναδεύουμε επί 15 λεπτά και αφήνουμε ξανά το σύστημα να ηρεμήσει. Μόλις απομακρυνθεί εκ νέου το επιπλέον υγρό χρησιμοποιείται ή εναπομένουσα ιλύς για να επαναληφθεί η δοκιμασία με το ίδιο υλικό σύμφωνα με τα σημεία 1.6.1.4 και 1.6.2. Η ενεργοποιημένη ιλύς μπορεί επίσης να απομονωθεί με φυγοκέντρηση αντί της καθίζησης.

Η προσαρμοσμένη ιλύς μπορεί να αναμειχθεί με νωπή ιλύ μέχρι 0,2 έως 1 g βάρους ξηράς ουσίας/λίτρο κατά μέγιστο όριο.

▼B

Αναλυτικά μέσα

Κατά κανόνα τα δείγματα διηθούνται με τη βοήθεια προσεκτικά εκπλυθέντος χάρτινου ηθμού (για την έκπλυση χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό).

Τα δείγματα που παραμένουν θολά διηθούνται με τη βοήθεια μεμβρανών διηθήσεως (0,45 μm).

Η συγκέντρωση DOC προσδιορίζεται εις διπλούν στα διηθήματα του δείγματος (τα πρώτα 5 ml απομακρύνονται) με τη βοήθεια οργάνου TOC. Στην περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να υποβληθεί αυθημερόν σε ανάλυση το διήθημα, φυλάσσεται στο ψυγείο μέχρι την επομένη ημέρα. Η περαιτέρω φύλαξη δεν συνιστάται.

Η συγκέντρωση COD προσδιορίζεται στα διηθήματα δείγματος με τη βοήθεια των οργάνων μετρήσεως του COD, σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην παραπομπή (2), κατωτέρω.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Οι συγκεντρώσεις DOC και COD στα δείγματα προσδιορίζονται τουλάχιστον δύο φορές, σύμφωνα με το σημείο 1.6.2 ανωτέρω. Η αποικοδόμηση κατά τον χρόνο T υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο (με τους ορισμούς) που αναφέρεται στο σημείο 1.2 ανωτέρω.

Ο αριθμός που εκφράζει την έκταση της αποικοδόμησης στρογγυλεύεται στην πλησιέστερη ακέραια εκατοστιαία μονάδα. Η αποικοδόμηση που έχει συντελεστεί στο τέλος της δοκιμασίας αποδίδεται ως «Βιοαποικοδομητικότητα στη δοκιμασία Zahn-Wellens».

Σημείωση: Στην περίπτωση που η αποικοδόμηση ολοκληρωθεί πρίν από τη λήξη του χρόνου της δοκιμασίας, και το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιωθεί με δεύτερη ανάλυση που διενεργείται την επομένη, η δοκιμασία μπορεί να περατωθεί.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

— την αρχική συγκέντρωση της ουσίας,

— κάθε άλλη πληροφορία καθώς και τα πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν την υπό δοκιμασία ουσία, την ουσία αναφοράς —εφόσον χρησιμοποιείται— και αυτήν της τυφλής δοκιμασίας,

— τη συγκέντρωση μετά από τρεις ώρες,

— την καμπύλη βιοαποικοδόμήσης, με περιγραφή,

— την ημερομηνία και τον τόπο δειγματοληψίας των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμασία, το βαθμό προσαρμογής, τη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση κλπ.,

— τους επιστημονικούς λόγους της τυχόν μεταβολής της διαδικασίας της δοκιμασίας.

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η βαθμιαία απώλεια του DOC (COD) σε διάστημα ημερών ή εβδομάδων αποτελεί ένδειξη ότι η υπό δοκιμασία ουσία βιοαποικοδομείται.

▼B

Σε ορισμένες περιπτώσεις ωστόσο, η φυσικοχημική προσρόφηση μπορεί να διαδραματίσει κάποιο ρόλο και αυτό φαίνεται όταν σημειώνεται ολική ή επιμέρους απώλεια από την αρχή, εντός των τριών πρώτων ωρών, και η διαφορά μεταξύ επιπλεόντων υγρών μαρτύρων και αυτών της δοκιμασίας κυμαίνεται σε μη αναμενόμενα χαμηλά επίπεδα.

Για να γίνει διάκριση μεταξύ βιοαποικοδόμησης (ή μερικής βιοαποικοδόμησης) και προσρόφησης είναι αναγκαίο να διενεργούνται περαιτέρω δοκιμασίες.

Αυτό μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, ο εγκυρότερος των οποίων είναι να χρησιμοποιηθεί το επιπλέον υγρό ως υλικό εμβολιασμού σε βασική δοκιμασία (κατά προτίμηση σε δοκιμασία με αναπνοόμετρο).

Υπό δοκιμασία ουσίες με υψηλή απώλεια DOC (COD) που δεν οφείλεται σε προσρόφηση πρέπει να θεωρούνται ως ενδεχομένως βιοαποικοδομήσιμες. Η ύπαρξη μερικής, μη οφειλόμενης σε προσρόφηση απώλειας αποτελεί ένδειξη ότι η χημική ουσία υπόκειται τουλάχιστον σε κάποιας έκτασης βιοαποικοδόμηση. Η ύπαρξη χαμηλής ή μηδενικής απώλειας DOC (COD) μπορεί να οφείλεται σε ανασταλτική δράση της υπό δοκιμασία ουσίας στους μικροοργανισμούς, και αυτό μπορεί επίσης να διαπιστωθεί με τη λύση και την απώλεια ιλύος, γεγονός που οδηγεί σε θολά επιπλέοντα υγρά. Στη περίπτωση αυτή η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί χρησιμοποιώντας ουσία χαμηλότερης περιεκτικότητας.

Η χρησιμοποίηση μιας ειδικής για τη συγκεκριμένη ένωση αναλυτικής μεθόδου ή σεσημασμένης με ^{14}C ουσίας της δοκιμασίας μπορεί να επιτρέψει την επίτευξη μεγαλύτερης ευαισθησίας. Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμασία ένωση σεσημασμένη με ^{14}C, η ανάκτηση $^{14}CO_2$ θα επιβεβαιώσει ότι συντελέστηκε βιοαποικοδόμηση.

Όταν τα αποτελέσματα εκφράζονται σε πρωτογενή βιοαπσικοδόμηση, πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να δοθεί κάποια εξήγηση για τη μεταβολή της χημικής δομής που οδηγεί σε έλλειψη ανταποκρίσεως εκ μέρους της αρχικής ουσίας της δοκιμασίας.

Η κατοχύρωση της εγκυρότητας της αναλυτικής μεθόδου πρέπει να γίνεται μαζί με την ανταπόκριση που διαπιστώνεται σε μέσο όπου διεξάγεται τυφλή δοκιμασία.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 302 B,* απόφαση του Συμβουλίου C(81)30 τελικό.

(2) Παράρτημα V C.9 Αποικοδόμηση: Χημική απαίτηση σε οξυγόνο, οδηγία 84/449/ΕΟΚ της Επιτροπής, *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων* αριθ. L 251 της 19.9.1984.

▼B

Προσάρτημα

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΕΚΤΙΜΗΣΕΩΣ

Οργανική Ενωση:	4-Αιθοξυβενζοϊκό οξύ
Θεωρητική συγκέντρωση της δοκιμασίας:	600 mg/l
Θεωρητικός DOC:	390 mg/l
Υλικό εμβολιασμού:	Σταθμός κατεργασίας αποβλήτων . . .
Συγκέντρωση;	1 g ξηράς ουσίας λίτρο
Βαθμός προσαρμογής:	μη προσαρμοσμένη
Ανάλυση:	Προσδιορισμός DOC
Ποσότητα δείγματος:	3 ml
Ουσία-μάρτυρας:	Διαιθυλενογλυκόλη
Τοξικότητα ενώσεως:	Δεν εμφανίζει τοξικότητα κάτω των 1 000 mg/l Χρησιμοποιούμενη δοκιμασία: Δοκιμασία ζυμώσεως σε σωλήνα

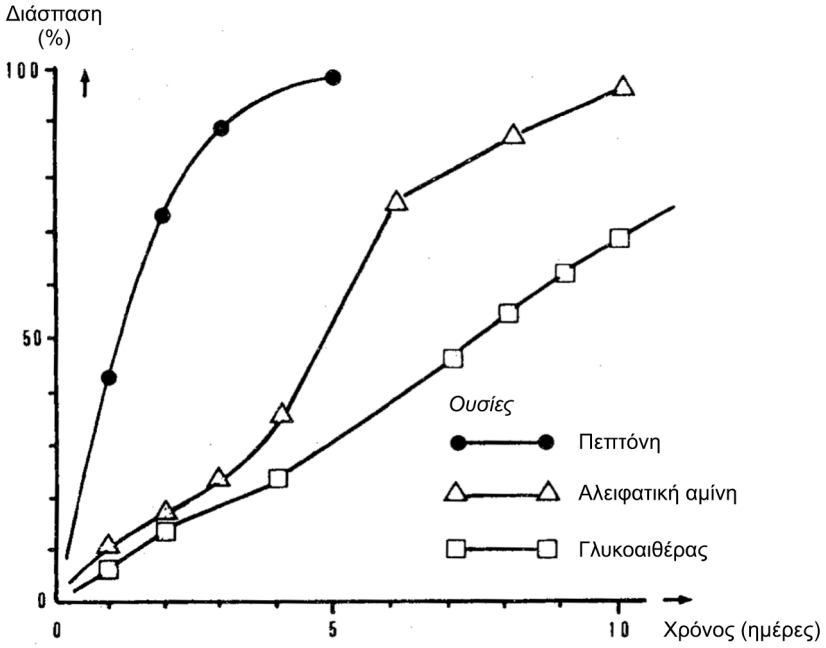
Χρόνος δοκιμασίας	Ουσία μάρτυρας				Ουσία δοκιμασίας		
	Τυφλό DOC (1) mg/l	DOC (1) mg/l	DOC καθαρό mg/l	Διάσπαση %	DOC (1) mg/l	DOC καθαρό mg/l	Διάσπαση %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 ώρες	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 ημέρα	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 ημέρες	3,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 ημέρες	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 ημέρες	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 ημέρες	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 ημέρες	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 ημέρες	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 ημέρες	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Μέσες τιμές τριπλών προσδιορισμών.

▼B

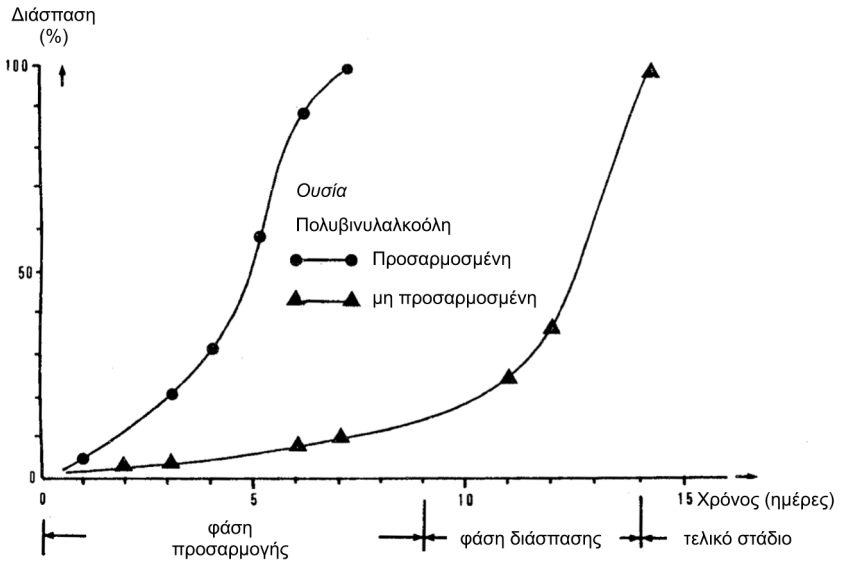
Σχήμα 1

Παραδείγματα καμπυλών βιοαποικοδόμησης



Σχήμα 2

Παραδείγματα προσαρμογής ιλύος



▼M4

Γ.10. **ΔΟΚΙΜΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΛΥΜΑΤΩΝ: Γ.10-Α: ΜΟΝΑΔΕΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ — Γ.10-Β: ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ**

Γ.10-Α: Μονάδες ενεργού ιλύος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 303 του ΟΟΣΑ (2001). Τη δεκαετία του ’50 έγινε αντιληπτό ότι οι νεοεισαχθείσες επιφανειοδραστικές ουσίες προκαλούσαν υπερβολικό αφρισμό σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και ποταμούς. Οι εν λόγω ουσίες δεν απομακρύνονταν πλήρως κατά την αερόβια επεξεργασία και, σε ορισμένες περιπτώσεις, περιόριζαν την απομάκρυνση άλλων οργανικών ουσιών. Αυτό υποκίνησε πολλές έρευνες σχετικά με το πώς θα μπορούσαν να απομακρύνονται οι επιφανειοδραστικές ουσίες από τα λύματα και το κατά πόσον οι νέες χημικές ουσίες που παράγονται από τη βιομηχανία επιδέχονται επεξεργασία λυμάτων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα μονάδων που αντιπροσωπεύουν τους δυο κύριους τύπους αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων (ενεργός ιλύς και διύλιση ή διήθηση με χαλικοδιυλιστήριο). Η διανομή κάθε νέας χημικής ουσίας και η παρακολούθηση εγκαταστάσεων επεξεργασίας μεγάλης κλίμακας θα ήταν πρακτικά ανέφικτες και δαπανηρές, ακόμη και σε τοπικό επίπεδο.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

Μονάδες ενεργού ιλύος

2. Έχουν περιγραφεί μοντέλα μονάδων ενεργού ιλύος των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ 300 ml και περίπου 2 000 ml. Ορισμένες μονάδες μιμούνταν σε μεγάλο βαθμό τις εγκαταστάσεις πλήρους κλίμακας, αφού διέθεταν δεξαμενές καθίζησης ιλύος όπου η καθιζάνουσα ιλύς διοχετεύεται εκ νέου στη δεξαμενή αερισμού, ενώ άλλες μονάδες δεν διέθεταν εγκαταστάσεις καθίζησης, π.χ. Swisher (1). Το μέγεθος της συσκευής είναι προϊόν συμβιβασμού. Αφενός, πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο για επιτυχή μηχανική λειτουργία και για την παροχή επαρκούς όγκου δειγμάτων δίχως να επηρεάζεται η λειτουργία και, αφετέρου, δεν πρέπει να είναι τόσο μεγάλο ώστε να απαιτεί υπερβολικό χώρο και υλικά.

3. Δύο μορφές συσκευών που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς και με ικανοποιητικά αποτελέσματα είναι οι μονάδες Husmann (2) και οι μονάδες πορώδους δοχείου (Porous Pot) (3)(4), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στη μελέτη των επιφανειοδραστικών ουσιών και περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα και άλλες συσκευές, π.χ. Eckenfelder (5). Λόγω του σχετικά υψηλού κόστους και της προσπάθειας που απαιτεί η παρούσα δοκιμή προσομοίωσης, διερευνήθηκαν παράλληλα απλούστερες και λιγότερο δαπανηρές δοκιμές διαλογής, οι οποίες έχουν πλέον ενσωματωθεί στο κεφάλαιο Γ.4, μέθοδοι Γ4-Α έως Γ4-Ζ του παρόντος παραρτήματος (6). Η πείρα από τις δοκιμές με πολλές επιφανειοδραστικές και άλλες χημικές ουσίες έχει καταδείξει ότι αυτές που σημείωσαν επιτυχία στις δοκιμές διαλογής (άμεσα βιοαποικοδομήσιμες) αποικοδομούνταν και στη δοκιμή προσομοίωσης. Ορισμένες από τις ουσίες που απέτυχαν στις δοκιμές διαλογής έχουν επιτύχει στις δοκιμές εγγενούς βιοαποικοδομησιμότητας [κεφάλαια Γ.12 (7) και Γ.19 (8) του παρόντος παραρτήματος], αλλά μόνο ορισμένες από τις τελευταίες αυτές αποικοδομήθηκαν στη δοκιμή προσομοίωσης, ενώ οι χημικές ουσίες που απέτυχαν στις δοκιμές εγγενούς βιοαποικοδομησιμότητας δεν αποικοδομήθηκαν στις δοκιμές προσομοίωσης (9)(10)(11).

4. Για ορισμένους σκοπούς θεωρούνται επαρκείς οι δοκιμές προσομοίωσης που διεξάγονται στο πλαίσιο ενός και μόνο συνόλου συνθηκών λειτουργίας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστιαία απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC). Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται μια τέτοια δοκιμή. Ωστόσο, σε αντίθεση με την προηγούμενη έκδοση του παρόντος κεφαλαίου, στην οποία περιγραφόταν μόνο ένας τύπος συσκευής επεξεργασίας συνθετικών λυμάτων στη μέθοδο σύζευξης, όπου χρησιμοποιείται μια σχετικά πρόχειρη μέθοδος για την περίσσεια ιλύος, το παρόν κείμενο προσφέρει μια σειρά από παραλλαγές. Περιγράφονται εναλλακτικές λύσεις σχετικά με τον τύπο

▼M4

της συσκευής, τον τρόπο λειτουργίας, τα λύματα και την απόοριψη της περίσσειας ιλύος. Το παρόν κείμενο είναι πιστό σε εκείνο του προτύπου ISO 11733 (12), το οποίο εξετάστηκε διεξοδικά κατά τη σύνταξή του, μολονότι η μέθοδος δεν έχει υποβληθεί σε κυκλική δοκιμή επικύρωσης.

5. Για άλλους σκοπούς απαιτείται να είναι γνωστή με μεγαλύτερη ακρίβεια η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στις εκροές και γι' αυτό χρειάζεται πιο διεξοδική μέθοδος. Για παράδειγμα, η παροχή περίσσειας ιλύος πρέπει να ελέγχεται με μεγαλύτερη ακρίβεια κατά τη διάρκεια κάθε ημέρας και καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής και οι μονάδες πρέπει να λειτουργούν με διάφορες παροχές περίσσειας ιλύος. Για την επίτευξη πλήρους μεθόδου, οι δοκιμές θα πρέπει επίσης να εκτελούνται σε δύο ή τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: μια τέτοια μέθοδος περιγράφεται από τον Birch (13)(14) και παρουσιάζεται συνοπτικά στο προσάρτημα 6. Ωστόσο, οι έως τώρα γνώσεις δεν αρκούν προκειμένου να αποφασισθεί ποιο από τα κινητικά μοντέλα έχει εφαρμογή στη βιοαποικοδόμηση των χημικών ουσιών κατά την επεξεργασία των λυμάτων και στο υδάτινο περιβάλλον εν γένει. Η εφαρμογή της κινητικής Monod, η οποία παρατίθεται ως παράδειγμα στο προσάρτημα 6, περιορίζεται σε χημικές ουσίες που είναι παρούσες σε συγκέντρωση 1 mg/l και άνω, αλλά κατά τη γνώμη ορισμένων, ακόμη και αυτό χρήζει τεκμηρίωσης. Στο προσάρτημα 7 υποδεικνύονται δοκιμές σε συγκεντρώσεις που αντικατοπτρίζουν ακριβέστερα εκείνες που διαπιστώνονται σε λύματα, αλλά οι δοκιμές αυτές, όπως και εκείνες του προσαρτήματος 6, περιλαμβάνονται σε προσαρτήματα αντί να δημοσιευθούν ως χωριστές μέθοδοι δοκιμών.

Φίλτρα

6. Πολύ λιγότερη προσοχή έχει δοθεί στα μοντέλα φίλτρων διύλισης, ίσως επειδή είναι πιο περίπλοκα και λιγότερο συμπαγή από τα μοντέλα εγκατάστασης ενεργού ιλύος. Οι Gerike et al. ανέπτυξαν μονάδες χαλικοδιυλιστηρίου οι οποίες λειτουργούσαν με τη μέθοδο σύζευξης (15). Τα φίλτρα αυτά ήταν σχετικά μεγάλα (ύψος 2 μ., όγκος 60 L) και το καθένα απαιτούσε 2 l λυμάτων ανά ώρα. Οι Baumann et al. (16) προσομοίωσαν χαλικοδιυλιστήρια εισάγοντας λωρίδες πολυεστερικού «πιλήματος» σε σωλήνες μήκους 1 μέτρου (εσωτερικής διαμέτρου 14 mm), οι οποίες είχαν προηγουμένως εμβαπτιστεί σε συμπυκνωμένη ενεργό ιλύ επί 30 λεπτά. Η ελεγχόμενη χημική ουσία, ως μοναδική πηγή άνθρακα (C) σε ένα διάλυμα ανόργανων αλάτων, τροφοδοτήθηκε στον κατακόρυφο σωλήνα από την κορυφή του και η βιοαποικοδόμηση εκτιμήθηκε βάσει μετρήσεων του DOC στις εκροές και του CO_2 στο εκλυόμενο αέριο.

7. Τα βιόφιλτρα έχουν προσομοιωθεί με άλλο τρόπον (15). Οι εσωτερικές επιφάνειες περιστρεφόμενων σωλήνων, τοποθετημένων υπό μικρή κλίση ως προς το οριζόντιο επίπεδο, τροφοδοτήθηκαν με λύματα (περίπου 250 ml/ώρα), με και χωρίς την ελεγχόμενη χημική ουσία, και οι συλλεγείσες εκροές αναλύθηκαν για την ανίχνευση DOC και/ή της συγκεκριμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Σκοπός της παρούσας μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της απομάκρυνσης και της πρωτοβάθμιας και/ή τελικής βιοαποικοδόμησης των υδατοδιαλυτών οργανικών χημικών ουσιών από αερόβιους μικροοργανισμούς σε συνεχούς λειτουργίας σύστημα δοκιμών που προσομοιώνει τη διεργασία ενεργού ιλύος. Ένα εύκολα βιοαποικοδομήσιμο οργανικό μέσο και η οργανική ελεγχόμενη χημική ουσία αποτελούν τις πηγές άνθρακα και ενέργειας για τους μικροοργανισμούς.

9. Δύο συνεχούς λειτουργίας μονάδες δοκιμής (εγκαταστάσεις ενεργού ιλύος ή πορώδη δοχεία) λειτουργούν παράλληλα υπό πανομοιότυπες συνθήκες, οι οποίες επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να εξυπηρετούν τον σκοπό της δοκιμής. Κατά κανόνα, ο μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής είναι 6 ώρες και η μέση ηλικία ιλύος (χρόνος παραμονής ιλύος) είναι 6 έως 10 ημέρες. Η περίσσεια ιλύος απορρίπτεται με μία από τις δύο μεθόδους, ενώ η ελεγχόμενη χημική ουσία προστίθεται συνήθως σε συγκέντρωση μεταξύ 10 mg/l και 20 mg/l διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στην εισροή (οργανικό μέσο) μιας μόνο από τις μονάδες. Η δεύτερη μονάδα χρησιμοποιείται ως μονάδα-μάρτυρας για τον προσδιορισμό της βιοαποικοδόμησης του οργανικού μέσου.

▼M4

10. Σε δείγματα που λαμβάνονται κατά συχνά διαστήματα από τις εκροές προσδιορίζονται ο DOC, κατά προτίμηση, ή το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) και η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (εφόσον απαιτείται) με ειδική ανάλυση, στην εκροή της μονάδας που δέχεται την ελεγχόμενη χημική ουσία. Η διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων DOC ή COD στις εκροές των μονάδων δοκιμής και μάρτυρα υποτίθεται ότι οφείλεται στην ελεγχόμενη χημική ουσία ή στους οργανικούς μεταβολίτες της. Η διαφορά αυτή συγκρίνεται με τη συγκέντρωση DOC ή COD στην εισροή, που οφείλεται στην προσθήκη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, προκειμένου να προσδιοριστεί η απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

11. Κατά κανόνα, η βιοαποικοδόμηση μπορεί να διακριθεί από τη βιοπροσρόφηση με προσεκτική εξέταση της καμπύλης απομάκρυνσης-χρόνου και, συνήθως, επιβεβαιώνεται με τη διεξαγωγή δοκιμής άμεσης βιοαποικοδόμησης, για την οποία χρησιμοποιείται ένα εγκλιματισμένο εμβόλιο από τη μονάδα που δέχεται την ελεγχόμενη χημική ουσία.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

12. Για να είναι δυνατή η ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά καθαρότητας, υδατοδιαλυτότητας, πτητικότητας και προσρόφησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Κατά κανόνα, οι πτητικές και οι αδιάλυτες χημικές ουσίες μπορούν να ελεγχθούν μόνο εάν λαμβάνονται ειδικές προφυλάξεις (βλέπε προσάρτημα 5). Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστή η χημική δομή ή τουλάχιστον ο εμπειρικός τύπος, ώστε να υπολογίζονται οι θεωρητικές τιμές και/ή να ελέγχονται οι μετρούμενες τιμές των παραμέτρων, π.χ. θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD), διαλυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) και χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD).

13. Οι πληροφορίες που αφορούν την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για μικροοργανισμούς (βλέπε προσάρτημα 4) μπορεί να είναι χρήσιμες για την επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής και να έχουν ουσιαστική σημασία για την ορθή ερμηνεία χαμηλών τιμών βιοαποικοδόμησης.

ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ

14. Κατά την αρχική εφαρμογή της παρούσας (επιβεβαιωτικής) δοκιμής προσομοίωσης στην πρωτοβάθμια βιοαποικοδόμηση των επιφανειοδραστικών ουσιών, απαιτείται η απομάκρυνση άνω του 80 % της συγκεκριμένης χημικής ουσίας για να επιτραπεί η διάθεση της επιφανειοδραστικής ουσίας στο εμπόριο. Εάν δεν επιτυγχάνεται η τιμή του 80 %, μπορεί να εφαρμοστεί η παρούσα (επιβεβαιωτική) δοκιμή προσομοίωσης και η επιφανειοδραστική ουσία μπορεί να διατεθεί στο εμπόριο μόνον εάν απομακρύνεται περισσότερο από το 90 % της συγκεκριμένης χημικής ουσίας. Δεν τίθεται ζήτημα επιτυχίας/αποτυχίας για τις χημικές ουσίες εν γένει και η τιμή ποσοστιαίας απομάκρυνσης που προκύπτει μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προσεγγιστικούς υπολογισμούς της πιθανής περιβαλλοντικής συγκέντρωσης που πρέπει να χρησιμοποιείται στις εκτιμήσεις των κινδύνων από τις χημικές ουσίες. Τα αποτελέσματα τείνουν να είναι απόλυτα (όλα ή τίποτα). Σε μια σειρά μελετών με καθαρές χημικές ουσίες, διαπιστώθηκε ποσοστιαία απομάκρυνση DOC > 90 % σε περισσότερο από τα τρία τέταρτα και > 80 % σε πάνω από το 90 % των χημικών ουσιών που παρουσίασαν σημαντικό βαθμό βιοαποικοδομησιμότητας.

15. Σχετικά λίγες χημικές ουσίες (π.χ. επιφανειοδραστικές ουσίες) περιέχονται σε λύματα στις συγκεντρώσεις (περίπου 10 mg C/l) που χρησιμοποιούνται στην παρούσα δοκιμή. Ορισμένες χημικές ουσίες μπορεί να είναι ανασταλτικές σε αυτές τις συγκεντρώσεις, ενώ η κινητική της απομάκρυνσης άλλων μπορεί να διαφέρει σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ακριβέστερη εκτίμηση της αποικοδόμησης θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη χρήση τροποποιημένων μεθόδων, με ρεαλιστικά χαμηλές συγκεντρώσεις των ελεγχόμενων χημικών ουσιών, και τα συλλεγόμενα δεδομένα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών. Ωστόσο, δεν έχουν ακόμη επικυρωθεί πλήρως οι απαραίτητες πειραματικές τεχνικές, ούτε έχουν εδραιωθεί τα κινητικά μοντέλα που περιγράφουν τις αντιδράσεις βιοαποικοδόμησης (βλέπε προσάρτημα 7).

▼M4

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

16. Για να διασφαλιστεί η ορθή διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, είναι χρήσιμη η κατά καιρούς δοκιμή χημικών ουσιών γνωστής συμπεριφοράς ταυτόχρονα με τη διερεύνηση των ελεγχόμενων χημικών ουσιών. Στις χημικές ουσίες αυτού του είδους συγκαταλέγονται το αδιπικό οξύ, η 2-φαινυλο φαινόλη, η 1-ναφθόλη, το διφαινικό οξύ, το 1-ναφθοϊκό οξύ κ.λπ. (9)(10)(11).

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

17. Οι εκθέσεις μελετών με αντικείμενο τις δοκιμές προσομοίωσης είναι πολύ λιγότερες σε σχέση με τις δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας. Η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ των (ταυτόχρονων) πολλαπλών προσδιορισμών (replicates) είναι ικανοποιητική (10-15 %) για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες που αποικοδομούνται σε ποσοστό 80 % ή περισσότερο, αλλά η μεταβλητότητα είναι μεγαλύτερη για χημικές ουσίες με λιγότερο ικανοποιητικό βαθμό αποικοδόμησης. Επίσης, με ορισμένες οριακές χημικές ουσίες έχουν καταγραφεί αποτελέσματα με μεγάλες αποκλίσεις (π.χ. 10 %, 90 %) σε διάφορες περιπτώσεις εντός των 9 εβδομάδων που προβλέπονται στη δοκιμή.

18. Μολονότι έχουν διαπιστωθεί ελάχιστες διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με τους δύο τύπους συσκευών, η αποικοδόμηση ορισμένων χημικών ουσιών είναι υψηλότερου βαθμού και σταθερότερη με οικιακά λύματα απ' ό,τι με τα συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εξοπλισμός

Σύστημα δοκιμής

19. Το σύστημα δοκιμής για μία ελεγχόμενη χημική ουσία αποτελείται από μια μονάδα δοκιμής και μια μονάδα-μάρτυρα. Σε περίπτωση όμως που εκτελούνται μόνο ειδικές αναλύσεις (πρωτοβάθμια βιοαποικοδόμηση), απαιτείται μόνο μια μονάδα δοκιμής. Μία μονάδα-μάρτυρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλές μονάδες δοκιμής που δέχονται είτε την ίδια είτε διαφορετικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες. Στην περίπτωση της σύζευξης (προσάρτημα 3), κάθε μονάδα δοκιμής πρέπει να συνοδεύεται από τη δική της μονάδα-μάρτυρα. Το σύστημα δοκιμής μπορεί να είναι είτε μοντέλο εγκατάστασης ενεργού ιλύος, μονάδα Husmann (προσάρτημα 1, σχήμα 1), ή πορώδες δοχείο (προσάρτημα 1, σχήμα 2). Και στις δύο περιπτώσεις απαιτούνται δοχεία αποθήκευσης επαρκούς μεγέθους για τις εισροές και τις εκροές, καθώς και αντλίες για την τροφοδοσία της εισροής, είτε σε μείγμα με διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είτε χωριστά.

20. Κάθε μονάδα εγκατάστασης ενεργού ιλύος αποτελείται από ένα δοχείο αερισμού με γνωστή χωρητικότητα, περίπου 3 λίτρων ενεργού ιλύος, και έναν διαχωριστήρα (δευτεροβάθμιος διαυγαστήρας), χωρητικότητας περίπου 1,5 λίτρων. Οι χωρητικότητες μπορούν, ως έναν βαθμό, να μεταβάλλονται με ρύθμιση του ύψους του διαχωριστήρα. Είναι αποδεκτά δοχεία διαφόρων μεγεθών, εφόσον λειτουργούν με συγκρίσιμα υδραυλικά φορτία. Εάν δεν είναι δυνατόν να διατηρηθεί η θερμοκρασία της αίθουσας δοκιμών στο επιθυμητό εύρος, συνιστάται η χρήση δοχείων με υδροχιτώνιο με νερό ελεγχόμενης θερμοκρασίας. Χρησιμοποιείται αεροκίνητη ή δοσομετρική αντλία για την ανακύκλωση της ενεργού ιλύος από τον διαχωριστήρα στο δοχείο αερισμού, είτε συνεχώς είτε ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

21. Το σύστημα πορώδους δοχείου αποτελείται από έναν εσωτερικό, πορώδη κύλινδρο με κωνικό πυθμένα, τοποθετημένος μέσα σε ένα ελαφρώς μεγαλύτερο δοχείο ίδιου σχήματος, το οποίο όμως είναι κατασκευασμένο από αδιαπέραστο πλαστικό υλικό. Κατάλληλο υλικό για το πορώδες δοχείο είναι το πορώδες πολυαιθυλένιο με πόρους μέγιστου μεγέθους 90 μm και πάχος 2 mm. Ο διαχωρισμός της ιλύος από το επεξεργασμένο οργανικό μέσο επιτυγχάνεται με διαφορική διέλευση μέσω του πορώδους τοιχώματος. Οι εκροές συλλέγονται στον δακτυλιοειδή χώρο, απ' όπου υπερχειλίζουν μέσα στο δοχείο συλλογής. Δεν γίνεται καθίζηση και, επομένως, δεν υπάρχει επιστροφή ιλύος. Ολόκληρο το σύστημα μπορεί να τοποθετηθεί σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο. Τα πορώδη δοχεία αποφράσσονται και ενδέχεται

▼M4

να υπερχειλίσουν στα αρχικά στάδια. Σε μια τέτοια περίπτωση, αντικαθίσταται η πορώδης επένδυση με καθαρή, με σιφωνισμό της ιλύος από το δοχείο σε έναν καθαρό κάδο και αφαίρεση της αποφραγμένης επένδυσης. Αφού σφογγιστεί ο αδιαπέραστος εξωτερικός κύλινδρος, εισάγεται μια καθαρή επένδυση και επαναφέρεται η ιλύς στο δοχείο. Επίσης, αποξέεται με προσοχή και μεταφέρεται τυχόν ιλύς που έχει προσκολληθεί στα τοιχώματα της αποφραγμένης επένδυσης. Τα αποφραγμένα δοχεία καθαρίζονται με εκτόξευση λεπτής δέσμης νερού για την απομάκρυνση της εναπομένουσας ιλύος και με εμβάπτιση, πρώτα σε αραιό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου και, στη συνέχεια, σε νερό, την οποία ακολουθεί επιμελής έκπλυση με νερό.

22. Για τον αερισμό της ιλύος στα δοχεία αερισμού και των δύο συστημάτων απαιτούνται κατάλληλες τεχνικές, όπως πορώδεις κύβοι (διαχυτήρες) και πεπιεσμένος αέρας. Εάν είναι αναγκαίο, ο αέρας καθαρίζεται διερχόμενος μέσω κατάλληλου φίλτρου και εκπλύνεται. Για να διατηρούνται οι αερόβιες συνθήκες και να παραμένουν οι κροκίδες ιλύος σε εναιώρημα καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, πρέπει να διέρχεται επαρκής αέρας από το σύστημα.

Συσκευή διήθησης ή φυγόκεντρος

23. Συσκευή για τη διήθηση των δειγμάτων με διηθητικές μεμβράνης κατάλληλου πορώδους (ονομαστική διάμετρος οπών 0,45 μm), οι οποίες προσροφούν διαλυτές οργανικές χημικές ουσίες και ελευθερώνουν οργανικό άνθρακα σε ελάχιστο βαθμό. Εάν χρησιμοποιούνται ηθμοί που ελευθερώνουν οργανικό άνθρακα, εκπλύνονται επιμελώς με θερμό νερό για την απομάκρυνση του στραγγίσιμου οργανικού άνθρακα. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί φυγόκεντρος ικανή να λειτουργεί σε 40 000 m/s^2.

Αναλυτικός εξοπλισμός

24. Συσκευή που απαιτείται για να προσδιοριστούν τα εξής:

— DOC (διαλυμένος οργανικός άνθρακας) και TOC (ολικός οργανικός άνθρακας) ή COD (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο),

— συγκεκριμένες χημικές ουσίες, εάν απαιτείται,

— αιωρούμενα στερεά, pH, συγκέντρωση οξυγόνου στο νερό,

— θερμοκρασία, οξύτητα και αλκαλικότητα,

— αμμώνιο και νιτρώδη και νιτρικά ιόντα, εάν η δοκιμή εκτελείται σε συνθήκες νιτροποίησης.

Νερό

25. Νερό βρύσης, που περιέχει λιγότερο από 3 mg/l DOC. Προσδιορίζεται η αλκαλικότητα εάν δεν είναι ήδη γνωστή.

26. Απιονισμένο νερό που περιέχει λιγότερο από 2 mg/l DOC.

Οργανικό μέσο

27. Ως οργανικό μέσο είναι αποδεκτά συνθετικά λύματα, οικιακά λύματα ή μείγμα των δύο. Έχει αποδειχθεί (11)(14) ότι η χρήση μόνο οικιακών λυμάτων έχει συχνά ως αποτέλεσμα αυξημένη ποσοστιαία απομάκρυνση DOC και επιτρέπει ακόμη και την απομάκρυνση και βιοαποικοδόμηση ορισμένων χημικών ουσιών που δεν βιοαποικοδομούνται όταν χρησιμοποιούνται συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ. Επίσης, η συνεχής ή διαλείπουσα προσθήκη οικιακών λυμάτων σταθεροποιεί συχνά την ενεργό ιλύ, καθώς και την κρίσιμης σημασίας ικανότητα καλής καθίζησης. Επομένως, συνιστάται η χρήση οικιακών λυμάτων. Μετράται η συγκέντρωση DOC ή COD σε κάθε νέα παρτίδα οργανικού μέσου. Η οξύτητα ή αλκαλικότητα του οργανικού μέσου θα πρέπει να είναι γνωστή. Εάν το οργανικό μέσο έχει χαμηλή οξύτητα ή αλκαλικότητα, μπορεί να απαιτείται η προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (όξινο ανθρακικό νάτριο ή δισόξινο φωσφορικό κάλιο) για τη διατήρηση του pH στην τιμή 7,5 ± 0,5 στο δοχείο αερισμού κατά τη δοκιμή. Η ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος που θα προστεθεί και ο χρόνος της προσθήκης του πρέπει να αποφασίζονται κατά περίπτωση. Όταν χρησιμοποιούνται μείγματα είτε συνεχώς είτε διακεκομμένα, ο DOC (ή το COD) του μείγματος πρέπει να διατηρείται σε μια κατά προσέγγιση σταθερή τιμή, π.χ. μέσω αραίωσης με νερό.

▼M4

Συνθετικά λύματα

28. Διαλύονται σε ένα λίτρο νερού βρύσης: πεπτόνη, 160 mg· εκχύλισμα κρέατος, 110 mg· ουρία, 30 mg, άνυδρο όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4), 28 mg· χλωριούχο νάτριο (NaCl), 7 mg· διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg· επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($Mg_2SO_4.7H_20$), 2 mg. Τα συγκεκριμένα συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ αποτελούν παράδειγμα και παρέχουν μέση συγκέντρωση DOC στην εισροή της τάξης των 100 mg/l. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται άλλες συνθέσεις, με την ίδια περίπου συγκέντρωση DOC, οι οποίες προσεγγίζουν περισσότερο τα πραγματικά λύματα. Εάν απαιτείται λιγότερο πυκνή εισροή, τα συνθετικά λύματα αραιώνονται με νερό βρύσης, για παράδειγμα σε αναλογία 1:1, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση περίπου 50 mg/l. Μια τέτοια ασθενέστερη εισροή θα επιτρέψει την καλύτερη ανάπτυξη των νιτροποιητικών οργανισμών και η τροποποίηση αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται εάν πρόκειται να διερευνηθεί η προσομοίωση εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων με νιτροποίηση. Αυτά τα συνθετικά λύματα μπορούν να παρασκευάζονται με αποσταγμένο νερό σε συμπυκνωμένη μορφή και να φυλάσσονται σε θερμοκρασία περίπου 1 °C για μέγιστο διάστημα μιας εβδομάδας. Όταν χρειάζονται, αραιώνονται με νερό βρύσης. (Το μέσο αυτό δεν είναι ικανοποιητικό, π.χ. η συγκέντρωση αζώτου είναι πολύ υψηλή, η περιεκτικότητα σε άνθρακα σχετικά χαμηλή, αλλά δεν έχει προταθεί καλύτερη εναλλακτική λύση, εκτός από την προσθήκη περισσότερου φωσφορικού άλατος ως ρυθμιστικού διαλύματος και επιπλέον πεπτόνης).

Οικιακά λύματα

29. Χρησιμοποιούνται πρόσφατα, καθιζημένα λύματα που συλλέγονται καθημερινά από εγκαταστάσεις επεξεργασίας οι οποίες δέχονται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα. Θα πρέπει να συλλέγονται, πριν από την πρωτοβάθμια καθίζηση, από την τάφρο υπερχείλισης της δεξαμενής πρωτοβάθμιας καθίζησης ή από την τροφοδοσία της εγκατάστασης ενεργού ιλύος, και να είναι σε μεγάλο βαθμό απαλλαγμένα από χονδρόκοκκα σωματίδια. Τα λύματα μπορούν να χρησιμοποιούνται αφού αποθηκευθούν για αρκετές ημέρες (γενικά όμως, όχι περισσότερο από επτά ημέρες) στους 4 °C περίπου, εάν αποδεικνύεται ότι ο DOC (ή το COD) δεν μειώνεται σημαντικά (δηλαδή κατά λιγότερο από 20 %) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Προκειμένου να περιοριστούν οι διαταραχές στο σύστημα, ο DOC (ή το COD) κάθε νέας παρτίδας θα πρέπει να ρυθμίζεται πριν από τη χρήση σε κατάλληλη σταθερή τιμή, π.χ. μέσω αραίωσης με νερό βρύσης.

Ενεργός ιλύς

30. Συλλέγεται ενεργός ιλύς για εμβολιασμό από τη δεξαμενή αερισμού μιας εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων που λειτουργεί αποτελεσματικά ή από εργαστηριακή μονάδα ενεργού ιλύος, η οποία επεξεργάζεται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα.

Διαλύματα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

31. Για χημικές ουσίες επαρκούς διαλυτότητας, παρασκευάζονται διαλύματα παρακαταθήκης κατάλληλων συγκεντρώσεων (π.χ. 1 έως 5 g/l) σε απιονισμένο νερό ή στο ανόργανο τμήμα των συνθετικών λυμάτων (για αδιάλυτες και πτητικές ουσίες, βλέπε προσάρτημα 5). Προσδιορίζεται ο DOC και ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) του διαλύματος παρακαταθήκης και επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις για κάθε νέα παρτίδα. Εάν η διαφορά μεταξύ του DOC και του TOC είναι μεγαλύτερη από 20 %, ελέγχεται η υδατοδιαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Συγκρίνεται ο DOC ή η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που έχει μετρηθεί με ειδική ανάλυση του διαλύματος παρακαταθήκης με την ονομαστική τιμή, προκειμένου να εξακριβωθεί αν η ανάκτηση είναι αρκετά ικανοποιητική (συνήθως αναμένεται > 90 %). Εξακριβώνεται, ειδικά για τις διασπορές, κατά πόσον ο DOC μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναλυτική παράμετρος ή αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μια ειδική για την ελεγχόμενη χημική ουσία αναλυτική τεχνική. Για τις διασπορές απαιτείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων. Για κάθε νέα παρτίδα μετράται ο DOC, ο COD ή η ελεγχόμενη χημική ουσία με ειδική ανάλυση.

▼M4

32. Προσδιορίζεται το pH του διαλύματος παρακαταθήκης. Τυχόν ακραίες τιμές υποδηλώνουν ότι η προσθήκη της χημικής ουσίας μπορεί να επιδρά στο pH της ενεργού ιλύος στο σύστημα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, εξουδετερώνεται το διάλυμα παρακαταθήκης, ώστε να επιτευχθεί pH 7 ± 0,5, με μικρές ποσότητες ανόργανου οξέος ή βάσης, αλλά πρέπει να αποφεύγεται η καθίζηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

33. Η διαδικασία περιγράφεται για τις μονάδες εγκατάστασης ενεργού ιλύος και θα πρέπει να προσαρμόζεται ελαφρά για το σύστημα πορώδους δοχείου.

Παρασκευή του εμβολίου

34. Κατά την έναρξη της δοκιμής, εμβολιάζεται το σύστημα δοκιμής είτε με ενεργό ιλύ είτε με εμβόλιο που περιέχει μικροοργανισμούς σε χαμηλή συγκέντρωση. Το εμβόλιο διατηρείται αεριζόμενο σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση του και χρησιμοποιείται εντός 24 ωρών. Στην πρώτη περίπτωση, λαμβάνεται δείγμα ενεργού ιλύος από τη δεξαμενή αερισμού μιας εγκατάστασης βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων που λειτουργεί αποτελεσματικά ή μιας εργαστηριακής εγκατάστασης επεξεργασίας, που δέχεται κυρίως οικιακά λύματα. Εάν πρόκειται να προσομοιωθούν οι συνθήκες νιτροποίησης, λαμβάνεται ιλύς από εγκατάσταση νιτροποιητικής επεξεργασίας λυμάτων. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών και, εάν είναι απαραίτητο, συμπυκνώνεται η ιλύς με καθίζηση, ώστε να είναι ελάχιστος ο όγκος που θα προστεθεί στο σύστημα δοκιμής. Εξακριβώνεται ότι η αρχική συγκέντρωση ξηράς ουσίας είναι περίπου 2,5 g/l.

35. Στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιούνται ως εμβόλιο 2 ml/l έως 10 ml/l εκροής από εγκατάσταση βιολογικής επεξεργασίας οικιακών λυμάτων. Για να υπάρξουν όσο το δυνατόν περισσότερα διαφορετικά είδη βακτηρίων, μπορεί να είναι χρήσιμο να προστεθούν εμβόλια από διάφορες άλλες πηγές, π.χ. από επιφανειακά ύδατα. Στην περίπτωση αυτή, η ενεργός ιλύς θα αναπτυχθεί και θα αυξηθεί στο σύστημα δοκιμής.

Τροφοδοσία του οργανικού μέσου

36. Εξακριβώνεται ότι τα δοχεία των εισροών και των εκροών, καθώς και οι σωληνώσεις από τα δοχεία εισροών προς τα δοχεία εκροών έχουν καθαριστεί επιμελώς προκειμένου να αφαιρεθεί η μικροβιακή χλωρίδα, τόσο στην αρχή όσο και σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Συναρμολογούνται τα συστήματα δοκιμής σε αίθουσα ελεγχόμενης θερμοκρασίας (κανονικό εύρος 20-25 °C) ή χρησιμοποιούνται μονάδες δοκιμής με υδροχιτώνιο. Παρασκευάζεται επαρκής όγκος του απαιτούμενου οργανικού μέσου (παράγραφοι 27-29). Αρχικά, το δοχείο αερισμού και ο διαχωριστήρας πληρούνται με το οργανικό μέσο και προστίθεται το εμβόλιο (παράγραφοι 34, 35). Αρχίζει ο αερισμός, ώστε η ιλύς να διατηρείται σε εναιώρημα και αερόβια κατάσταση, και έπειτα η τροφοδοσία της εισροής και η ανακύκλωση της καθιζάνουσας ιλύος. Μεταφέρεται οργανικό μέσο από τα αποθηκευτικά δοχεία στα δοχεία αερισμού (παράγραφοι 20, 21) των μονάδων δοκιμής και μάρτυρα και συλλέγονται οι αντίστοιχες εκροές σε παρόμοια αποθηκευτικά δοχεία. Για να επιτευχθεί ο κανονικός υδραυλικός χρόνος παραμονής των 6 ωρών, το οργανικό μέσο αντλείται με παροχή 0,5 l/ώρα. Για να επιβεβαιωθεί η παροχή αυτή, μετράται η ημερήσια ποσότητα τροφοδοσίας οργανικού μέσου, με καταγραφή της μείωσης του όγκου του μέσου στα δοχεία αποθήκευσης. Για τον προσδιορισμό των επιδράσεων της διαλείπουσας ελευθέρωσης και της αιφνίδιας φόρτισης (σοκ) χημικών ουσιών απαιτούνται άλλοι τρόποι τροφοδοσίας.

37. Εάν το οργανικό μέσο παρασκευάζεται για να χρησιμοποιηθεί πέραν της 1 ημέρας αργότερα, απαιτείται ψύξη στους 4 °C περίπου, ή άλλη κατάλληλη μέθοδος διατήρησης για να αποφευχθούν η ανάπτυξη μικροβίων και η βιοαποικοδόμηση εκτός των μονάδων δοκιμής (παράγραφος 29). Εάν χρησιμοποιούνται συνθετικά λύματα, είναι δυνατόν να παρασκευαστεί και να αποθηκευτεί στους 4 °C περίπου ένα πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης (π.χ. με συγκέντρωση 10πλάσια της κανονικής, παράγραφος 28). Το εν λόγω διάλυμα παρακαταθήκης μπορεί να αναμειχθεί καλά με τον κατάλληλο όγκο νερού βρύσης πριν από τη χρήση. Εναλλακτικά, μπορεί να αντληθεί απευθείας, ενώ η κατάλληλη ποσότητα νερού βρύσης αντλείται χωριστά.

▼M4

Τροφοδοσία της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

38. Κατάλληλος όγκος διαλύματος παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (παράγραφος 31) προστίθεται στο δοχείο αποθήκευσης της εισροής ή εισάγεται απευθείας, με χωριστή αντλία, στο δοχείο αερισμού. Η κανονική μέση συγκέντρωση δοκιμής στην εισροή πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 10 mg/l και 20 mg/l DOC, ενώ η ανώτερη συγκέντρωση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 50 mg/l. Εάν η υδατοδιαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι χαμηλή ή είναι πιθανό να σημειωθούν τοξικές επιδράσεις, μειώνεται η συγκέντρωση DOC σε 5 mg/l ή σε ακόμη χαμηλότερο επίπεδο, μόνο όμως εάν διατίθεται και εφαρμόζεται κατάλληλη ειδική αναλυτική μέθοδος (ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε μορφή διασποράς, που είναι δυσδιάλυτες στο νερό, μπορούν να προστεθούν με τη χρήση ειδικών δοσομετρικών τεχνικών, βλέπε προσάρτημα 5).

39. Αρχίζει η προσθήκη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μετά από μια περίοδο κατά την οποία το σύστημα έχει σταθεροποιηθεί και απομακρύνει αποτελεσματικά (περίπου κατά 80 %) τον DOC του οργανικού μέσου. Είναι σημαντικό να εξακριβώνεται ότι όλες οι μονάδες λειτουργούν εξίσου αποτελεσματικά, πριν από την προσθήκη της χημικής ουσίας. Σε αντίθετη περίπτωση, είναι συνήθως χρήσιμο να αναμειγνύονται οι επιμέρους ιλύες και να αναδιανέμονται ίσοι όγκοι στις επιμέρους μονάδες. Όταν χρησιμοποιείται εμβόλιο με (περίπου) 2,5 g/l (ξηρό βάρος) ενεργού ιλύος, η ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να προστίθεται από την αρχή της δοκιμής, δεδομένου ότι η απευθείας προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων από την αρχή έχει το πλεονέκτημα ότι η ενεργός ιλύς μπορεί να προσαρμόζεται καλύτερα στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Ανεξαρτήτως του τρόπου με τον οποίο προστίθεται η ελεγχόμενη χημική ουσία, συνιστάται η μέτρηση της σχετικής ταχύτητας ροής και/ή των όγκων στα δοχεία αποθήκευσης ανά τακτά διαστήματα.

Χειρισμός της ενεργού ιλύος

40. Κατά κανόνα, η συγκέντρωση των στερεών της ενεργού ιλύος σταθεροποιείται κατά τη δοκιμή, ανεξάρτητα από το χρησιμοποιούμενο εμβόλιο, εντός ορίων της τάξης του 1 έως 3 g/l (ξηρό βάρος), ανάλογα με την ποιότητα και τη συγκέντρωση του οργανικού μέσου, τις συνθήκες λειτουργίας, το είδος των παρόντων μικροοργανισμών και την επίδραση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

41. Προσδιορίζονται τα αιωρούμενα στερεά στα δοχεία αερισμού τουλάχιστον εβδομαδιαίως και απορρίπτεται η πλεονάζουσα ιλύς ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση εντός των ορίων 1 g/l έως 3 g/l (ξηρό βάρος) ή ελέγχεται η μέση ηλικία ιλύος ώστε να διατηρείται σε σταθερή τιμή, συνήθως μεταξύ 6 και 10 ημερών. Εάν, για παράδειγμα, επιλεγεί χρόνος παραμονής ιλύος 8 ημερών, αφαιρείται καθημερινά το 1/8 του όγκου της ενεργού ιλύος στο δοχείο αερισμού και απορρίπτεται. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία σε καθημερινή βάση ή, κατά προτίμηση, με αυτόματη αντλία διαλείπουσας λειτουργίας. Η διατήρηση της συγκέντρωσης των αιωρούμενων στερεών σε σταθερό επίπεδο ή εντός στενών ορίων δεν συνεπάγεται τη διατήρηση σταθερού χρόνου παραμονής της ιλύος (SRT), ο οποίος αποτελεί τη μεταβλητή λειτουργίας που καθορίζει την τιμή της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στις εκροές.

42. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αφαιρείται, τουλάχιστον ημερησίως, τυχόν ιλύς που έχει προσκολληθεί στα τοιχώματα του δοχείου αερισμού και του διαχωριστήρα, ούτως ώστε να επαναιωρείται. Ελέγχονται και καθαρίζονται τακτικά όλοι οι σωλήνες και τις σωληνώσεις για την πρόληψη της ανάπτυξης βιομεμβράνης. Ανακυκλώνεται η καθιζημένη ιλύς από τον διαχωριστήρα στο δοχείο αερισμού, κατά προτίμηση με διαλείπουσα άντληση. Στο σύστημα πορώδους δοχείου δεν γίνεται ανακύκλωση, αλλά πρέπει να εξασφαλίζεται η εισαγωγή καθαρών εσωτερικών δοχείων προτού αυξηθεί σημαντικά ο όγκος στο δοχείο (παράγραφος 21).

43. Στις μονάδες εγκατάστασης Husmann ενδέχεται να σημειωθεί ανεπαρκής καθίζηση και απώλεια ιλύος, που μπορούν να διορθωθούν με μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες ενέργειες που παρατίθενται, στις μονάδες δοκιμής και μάρτυρα παράλληλα:

— προσθήκη πρόσφατης ιλύος ή κροκιδωτή (για παράδειγμα, 2 ml/δοχείο διαλύματος $FeCl_3$ 50 g/l) ανά τακτά διαστήματα, π.χ. εβδομαδιαίως, αλλά πρέπει να εξακριβώνεται ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν αντιδρά ούτε καταβυθίζεται με $FeCl_3$,

▼M4

— αντικατάσταση της αεροκίνητης αντλίας από περισταλτική, ώστε να καθίσταται δυνατή μια ροή ανακυκλοφορίας ιλύος η οποία σχεδόν ισούται προς την παροχή εισροής που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, καθώς και η ανάπτυξη αναερόβιας ζώνης στην καθιζημένη ιλύ (τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της αεροκίνητης αντλίας περιορίζουν την ελάχιστη ταχύτητα ροής της ιλύος που επιστρέφει στο12πλάσιο της παροχής εισροής),

— διαλείπουσα άντληση της ιλύος από τον διαχωριστήρα προς το δοχείο αερισμού (π.χ. 5 λεπτά ανά 2,5 ώρες για την ανακύκλωση 1 l/ώρα έως 1,5 l/ώρα,

— χρήση μη τοξικού αντιαφριστικού μέσου σε ελάχιστη συγκέντρωση για την πρόληψη της απώλειας μέσω αφρισμού (π.χ. έλαιο σιλικόνης),

— διαβίβαση αέρα μέσω της ιλύος στον διαχωριστήρα με σύντομες, ισχυρές ριπές (π.χ. 10 δευτερόλεπτα ανά ώρα),

— τροφοδοσία του οργανικού μέσου κατά διαστήματα στο δοχείο αερισμού (π.χ. 3 έως 10 λεπτά ανά ώρα).

Δειγματοληψία και ανάλυση

44. Σε τακτά χρονικά διαστήματα μετράται η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, η θερμοκρασία και το pH της ενεργού ιλύος στα δοχεία αερισμού. Εξακριβώνεται ότι είναι πάντα διαθέσιμο επαρκές οξυγόνο (> 2 mg/l) και ότι η θερμοκρασία διατηρείται στις απαιτούμενες τιμές (κατά κανόνα μεταξύ 20 °C και 25 °C). Διατηρείται το pH στην τιμή 7,5 ± 0,5 με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων ανόργανης βάσης ή ανόργανου οξέος στο δοχείο αερισμού ή στην εισροή ή με αύξηση της ρυθμιστικής ικανότητας του οργανικού μέσου (βλέπε παράγραφο 27). Σε περίπτωση νιτροποίησης παράγεται οξύ, καθώς η οξείδωση 1 mg N παράγει το ισοδύναμο περίπου 7 mg CO_3^-. Η συχνότητα των μετρήσεων εξαρτάται από την παράμετρο που πρόκειται να μετρηθεί και τη σταθερότητα του συστήματος και μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ ημερήσιων και εβδομαδιαίων μετρήσεων.

45. Μετράται ο DOC ή το COD στις εισροές των δοχείων δοκιμής και μάρτυρα. Μετράται η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή της μονάδας δοκιμής με ειδική ανάλυση ή υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης (παράγραφος 31), τον όγκο που χρησιμοποιήθηκε και την ποσότητα της τροφοδοσίας λυμάτων στη μονάδα δοκιμής. Συνιστάται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, ώστε να μειώνεται η μεταβλητότητα των δεδομένων συγκέντρωσης.

46. Λαμβάνονται κατάλληλα δείγματα από τη συλλεγόμενη εκροή (π.χ. σύνθετα 24ώρου) και διηθούνται μέσω μεμβράνης με πόρους μεγέθους 0,45 μm ή φυγοκεντρούνται σε περίπου 40 000 m/s^2 για περίπου 15 λεπτά. Η φυγοκέντρηση θα πρέπει να χρησιμοποιείται εάν δεν είναι εύκολη η διήθηση. Προσδιορίζεται ο DOC ή το COD τουλάχιστον εις διπλούν για τη μέτρηση της τελικής βιοαποικοδόμησης και, εφόσον απαιτείται, της πρωτοβάθμιας βιοαποικοδόμησης, με ειδική για την ελεγχόμενη χημική ουσία ανάλυση.

47. Η χρήση του COD μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα ανάλυσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις και, συνεπώς, συνιστάται μόνο εάν χρησιμοποιείται αρκετά υψηλή συγκέντρωση δοκιμής (περίπου 30 mg/l). Επίσης, για ισχυρά προσροφώμενες χημικές ουσίες, συνιστάται η μέτρηση της ποσότητας της προσροφημένης χημικής ουσίας στην ιλύ με ειδική για την ελεγχόμενη χημική ουσία αναλυτική τεχνική.

48. Η συχνότητα δειγματοληψίας εξαρτάται από την αναμενόμενη διάρκεια της δοκιμής. Μια συνιστώμενη συχνότητα είναι τρεις φορές την εβδομάδα. Όταν οι μονάδες αρχίσουν να λειτουργούν αποδοτικά, παρέχεται ένα χρονικό περιθώριο 1 έως 6 το πολύ εβδομάδων μετά την εισαγωγή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, ώστε η προσαρμογή να φτάσει σε σταθερή κατάσταση. Για την αξιολόγηση του αποτελέσματος της δοκιμής, λαμβάνονται κατά προτίμηση τουλάχιστον 15 έγκυρες τιμές στη φάση οριζοντίωσης (παράγραφος 59), η οποία συνήθως διαρκεί 3 εβδομάδες. Η δοκιμή μπορεί να ολοκληρωθεί, εάν έχει επιτευχθεί επαρκής βαθμός απομάκρυνσης (π.χ. > 90 %) και είναι διαθέσιμες οι εν λόγω 15 τιμές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις αναλύσεις κάθε εργάσιμης ημέρας για πάνω από 3 εβδομάδες. Κατά κανόνα, η διάρκεια δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 12 εβδομάδες μετά την προσθήκη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

▼M4

49. Εάν η ιλύς νιτροποιείται και πρόκειται να μελετηθούν οι επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη νιτροποίηση, δείγματα από τις εκροές των μονάδων δοκιμής και μάρτυρα υποβάλλονται σε ανάλυση, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, για αμμώνιο και/ή για νιτρώδη και νιτρικά ιόντα.

50. Όλες οι αναλύσεις θα πρέπει να εκτελούνται το συντομότερο δυνατόν, ιδίως οι προσδιορισμοί του αζώτου. Εάν χρειάζεται να αναβληθούν οι αναλύσεις, τα δείγματα φυλάσσονται στους 4 °C περίπου, στο σκοτάδι, μέσα σε πλήρεις, ερμητικά σφραγισμένες φιάλες. Εάν τα δείγματα πρέπει να φυλαχθούν για περισσότερο από 48 ώρες, διατηρούνται με κατάψυξη, οξίνιση (π.χ. 10 ml/l διαλύματος θειικού οξέος 400 g/l) ή με την προσθήκη κατάλληλης τοξικής χημικής ουσίας (π.χ. 20 ml/l διαλύματος χλωριούχου υδραργύρου (II) 10 g/l). Εξακριβώνεται ότι η τεχνική διατήρησης δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Σύζευξη των μονάδων ελέγχου

51. Εάν πρόκειται να εφαρμοστεί σύζευξη (προσάρτημα 3), ανταλλάσσεται καθημερινά η ίδια ποσότητα ενεργού ιλύος (150 ml έως 1 500 ml για τα δοχεία αερισμού που περιέχουν 3 λίτρα υγρού) μεταξύ των δοχείων αερισμού της μονάδας δοκιμής και της οικείας μονάδας-μάρτυρα. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία προσροφάται ισχυρά στην ιλύ, αλλάζεται μόνο το υπερκείμενο υγρό των διαχωριστήρων. Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιείται διορθωτικός συντελεστής για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων της δοκιμής (παράγραφος 55).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

52. Υπολογίζεται το ποσοστό απομάκρυνσης του DOC ή του COD της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για κάθε χρόνο εκτίμησης, με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

όπου

D_t = % απομάκρυνση του DOC ή COD σε χρόνο t

C_s = DOC ή COD στην εισροή λόγω της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, υπολογιζόμενο κατά προτίμηση από το διάλυμα παρακαταθήκης (mg/l)

E = μετρούμενη τιμή DOC ή COD στην εκροή της μονάδας δοκιμής σε χρόνο t (mg/l)

E_o = μετρούμενη τιμή DOC ή COD στην εκροή της μονάδας-μάρτυρα σε χρόνο t (mg/l)

53. Ο βαθμός απομάκρυνσης του DOC ή COD του οργανικού μέσου στη μονάδα-μάρτυρα αποτελεί χρήσιμο στοιχείο για την εκτίμηση της βιοαποικοδομητικής δραστικότητας της ενεργού ιλύος κατά τη δοκιμής. Υπολογίζεται η ποσοστιαία απομάκρυνση από την εξίσωση:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

όπου

D_B = % απομάκρυνση του DOC ή COD του οργανικού μέσου στη μονάδα-μάρτυρα σε χρόνο t

C_M = DOC ή COD του οργανικού μέσου στην εισροή της μονάδας-μάρτυρα (mg/l)

▼M4

Προαιρετικά, υπολογίζεται το ποσοστό απομάκρυνσης του DOC ή COD λόγω του οργανικού μέσου με την ελεγχόμενη χημική ουσία στη μονάδα δοκιμής από την εξίσωση:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

όπου

D_T = % απομάκρυνση του DOC ή COD από τη συνολική εισροή της μονάδας δοκιμής

C_T = DOC ή COD της συνολικής εισροής της μονάδας δοκιμής ή υπολογιζόμενα από τα διαλύματα παρακαταθήκης (mg/l)

54. Υπολογίζεται η απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κάθε χρόνο εκτίμησης, εάν έχει μετρηθεί με ειδική μέθοδο ανάλυσης, από την εξίσωση:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

όπου

D_{ST} = % πρωτοβάθμια απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε χρόνο t

S_i = μετρούμενη ή εκτιμώμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή της μονάδας δοκιμής (mg/l)

S_e = μετρούμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εκροή της μονάδας δοκιμής σε χρόνο t (mg/l)

55. Εάν έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος σύζευξης, αντισταθμίζεται η αραίωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο δοχείο αερισμού λόγω της ανταλλαγής ιλύος με την εφαρμογή διορθωτικού συντελεστή (βλέπε προσάρτημα 3). Σε περίπτωση που έχουν εφαρμοστεί μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής 6 ωρών και ανταλλαγή του μισού όγκου της ενεργού ιλύος στο δοχείο αερισμού, οι προσδιορισθείσες ημερήσιες τιμές απομάκρυνσης (D_t, παράγραφος 52) πρέπει να διορθωθούν, για να προκύψει ο πραγματικός βαθμός απομάκρυνσης, D_{tc}, της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από την εξίσωση:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Έκφραση των αποτελεσμάτων της δοκιμής

56. Σχεδιάζεται γραφική παράσταση του ποσοστού απομάκρυνσης D_t (ή D_{tc}) και D_{st}, εάν είναι διαθέσιμο, συναρτήσει του χρόνου (βλέπε προσάρτημα 2). Από το σχήμα της καμπύλης απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (αυτής καθαυτής ή ως DOC) μπορούν να συναχθούν ορισμένα συμπεράσματα σχετικά με τη διεργασία απομάκρυνσης.

Προσρόφηση

57. Εάν παρατηρηθεί υψηλός βαθμός απομάκρυνσης του DOC της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από την αρχή της δοκιμής, η ελεγχόμενη χημική ουσία πιθανώς απομακρύνεται με προσρόφηση στα στερεά της ενεργού ιλύος. Η απόδειξη αυτού είναι δυνατή με τον προσδιορισμό της προσροφημένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας με ειδική ανάλυση. Δεν είθισται να παραμένει υψηλή η απομάκρυνση του DOC των προσροφήσιμων χημικών ουσιών καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Κατά κανόνα, ο βαθμός απομάκρυνσης είναι αρχικά υψηλός και, στη συνέχεια, μειώνεται σταδιακά σε μια τιμή ισορροπίας. Εάν, ωστόσο, η προσροφήσιμη ελεγχόμενη χημική ουσία ήταν ικανή να προκαλέσει με οποιονδήποτε τρόπο εγκλιματισμό του μικροβιακού πληθυσμού, η απομάκρυνση του DOC της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα αυξανόταν στη συνέχεια φθάνοντας σε υψηλή τιμή ορίζοντίωσης της καμπύλης.

▼M4

Λανθάνουσα φάση

58. Όπως και στις στατικές δοκιμές διαλογής, για πολλές ελεγχόμενες χημικές ουσίες απαιτείται μια λανθάνουσα φάση πριν από την πλήρη βιοαποικοδόμηση. Κατά τη λανθάνουσα φάση, συντελείται εγκλιματισμός ή προσαρμογή των βακτηριδίων αποικοδόμησης, με σχεδόν μηδενική απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στη συνέχεια, αρχίζουν να αναπτύσσονται τα βακτηρίδια αυτά. Η συγκεκριμένη φάση ολοκληρώνεται και η φάση αποικοδόμησης θεωρείται ότι αρχίζει όταν έχει απομακρυνθεί περίπου το 10 % της αρχικής ποσότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (λαμβανομένης υπόψη της προσρόφησης, εάν υπάρξει). Η λανθάνουσα φάση παρουσιάζει συχνά μεγάλη μεταβλητότητα και μικρή αναπαραγωγιμότητα.

Φάση σταθερής οριζοντίωσης

59. Η φάση οριζοντίωσης της καμπύλης απομάκρυνσης σε μια συνεχή δοκιμή ορίζεται ως η φάση κατά την οποία σημειώνεται η μέγιστη αποικοδόμηση. Η φάση οριζοντίωσης θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 3 εβδομάδες και να εμφανίζει περίπου 15 έγκυρες μετρηθείσες τιμές.

Μέσος βαθμός απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

60. Υπολογίζεται η μέση τιμή από τις τιμές απομάκρυνσης (D_t) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη φάση οριζοντίωσης. Η τιμή αυτή, αφού στρογγυλοποιηθεί στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό (1 %), είναι ο βαθμός απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Συνιστάται επίσης ο υπολογισμός του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % της μέσης τιμής.

Απομάκρυνση του οργανικού μέσου

61. Σχεδιάζεται γραφική παράσταση του ποσοστού της απομάκρυνσης του DOC ή COD του οργανικού μέσου στη μονάδα-μάρτυρα (D_B) συναρτήσει του χρόνου. Αναφέρεται ο μέσος βαθμός απομάκρυνσης με τον ίδιο τρόπο όπως και για την ελεγχόμενη χημική ουσία (παράγραφος 60).

Ένδειξη βιοαποικοδόμησης

62. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν προσροφάται σημαντικά στην ενεργό ιλύ και η καμπύλη απομάκρυνσης έχει το τυπικό σχήμα μιας καμπύλης βιοαποικοδόμησης, με λανθάνουσα φάση, φάση αποικοδόμησης και φάση οριζοντίωσης (παράγραφοι 58, 59), η μετρούμενη απομάκρυνση μπορεί με ασφάλεια να αποδοθεί σε βιοαποικοδόμηση. Εάν έχει σημειωθεί υψηλός βαθμός αρχικής απομάκρυνσης, η δοκιμή προσομοίωσης δεν μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ βιολογικών και αβιοτικών διεργασιών απομάκρυνσης. Σε τέτοιες περιπτώσεις, καθώς και σε άλλες όπου υπάρχει αμφιβολία σχετικά με τη βιοαποικοδόμηση (π.χ. αφαίρεση), εκτελείται ανάλυση των προσροφημένων ελεγχόμενων χημικών ουσιών ή διεξάγονται πρόσθετες στατικές δοκιμές βιοαποικοδόμησης με βάση τις παραμέτρους που αποτελούν σαφείς ενδείξεις βιολογικών διεργασιών. Οι δοκιμές αυτές είναι οι μέθοδοι πρόσληψης οξυγόνου [κεφάλαιο Γ.4, μέθοδοι Δ, Ε και Ζ του παρόντος παραρτήματος (6)] ή η δοκιμή με μέτρηση της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα [κεφάλαιο Γ.4, μέθοδος Γ του παρόντος παραρτήματος (6)] ή η μέθοδος υπερκείμενης φάσης του ISO (18), στις οποίες χρησιμοποιείται προεκτεθειμένο εμβόλιο από τη δοκιμή προσομοίωσης. Εάν έχουν μετρηθεί τόσο η απομάκρυνση DOC, όσο και η απομάκρυνση συγκεκριμένων χημικών ουσιών, σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποσοστών που απομακρύνονται (το πρώτο να είναι χαμηλότερο από το δεύτερο) υποδηλώνουν την παρουσία ενδιάμεσων οργανικών προϊόντων στις εκροές, τα οποία μπορεί να είναι πιο δύσκολο να αποικοδομηθούν σε σύγκριση με τη μητρική χημική ουσία.

Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμής

63. Λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την κανονική συμπεριφορά βιοαποικοδόμησης του εμβολίου, εάν προσδιορίζεται ο βαθμός απομάκρυνσης του οργανικού μέσου (παράγραφος 53) στη μονάδα-μάρτυρα. Η δοκιμή θεωρείται έγκυρη εάν ο βαθμός απομάκρυνσης DOC ή COD στις μονάδες-μάρτυρες είναι > 80 % μετά από δύο εβδομάδες και δεν έχουν καταγραφεί ασυνήθιστες παρατηρήσεις.

▼M4

64. Εάν έχει χρησιμοποιηθεί ευκόλως βιοαποικοδομήσιμη χημική ουσία (αναφοράς), ο βαθμός βιοαποικοδόμησης (D_t, παράγραφος 52), πρέπει να είναι > 90 %.

65. Εάν η δοκιμή διεξάγεται υπό συνθήκες νιτροποίησης, η μέση συγκέντρωση στις εκροές πρέπει να είναι<1 mg/l αμμωνιακού N και<2 mg/l N νιτρωδών ιόντων.

66. Εάν δεν πληρούνται τα ανωτέρω κριτήρια (παράγραφοι 63-65), επαναλαμβάνεται η δοκιμή με εμβόλιο από διαφορετική πηγή, υποβάλλεται σε δοκιμή μια χημική ουσία αναφοράς και επανεξετάζονται όλες οι πειραματικές διαδικασίες.

Έκθεση δοκιμής

67. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— δεδομένα ταυτοποίησης,

— φυσική μορφή και, όπου απαιτείται, φυσικοχημικές ιδιότητες.

Συνθήκες δοκιμής:

— τύπος του συστήματος δοκιμής και τυχόν τροποποιήσεις για τη δοκιμή αδιάλυτων και πτητικών χημικών ουσιών,

— τύπος οργανικού μέσου,

— αναλογία και είδος των βιομηχανικών αποβλήτων στα λύματα, εφόσον είναι γνωστά,

— εμβόλιο, είδος και σημεία δειγματοληψίας, συγκέντρωση και τυχόν προεπεξεργασία,

— διάλυμα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας: περιεκτικότητα σε DOC και TOC, τρόπος παρασκευής, εναιώρημα ή όχι, συγκέντρωση δοκιμής που χρησιμοποιήθηκε, λόγοι για τους οποίους ο DOC δεν κυμαινόταν μεταξύ 10 και 20 mg/l, μέθοδος προσθήκης, ημερομηνία πρώτης προσθήκης, τυχόν αλλαγές,

— μέση ηλικία ιλύος και μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής, μέθοδος απόρριψης της περίσσειας ιλύος, μέθοδοι για την αντιμετώπιση της διόγκωσης, της απώλειας ιλύος κ.λπ.,

— αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν,

— θερμοκρασία δοκιμής,

— ιδιότητες της διόγκωσης ιλύος, δείκτης όγκου ιλύος (ΔΟΠ), αιωρούμενα στερεά ανάμικτου υγρού (MLSS),

— τυχόν αποκλίσεις από τις τυποποιημένες διαδικασίες και περιστάσεις που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει τα αποτελέσματα.

Αποτελέσματα της δοκιμής:

— όλα τα μετρηθέντα δεδομένα (DOC, COD, ειδικές αναλύσεις, pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση οξυγόνου, αιωρούμενα στερεά, αζωτούχες χημικές ουσίες, εάν έχουν σημασία,

— όλες οι υπολογισθείσες τιμές D_t (ή D_{tc}), D_B, D_{St} σε μορφή πίνακα και οι καμπύλες απομάκρυνσης,

— πληροφορίες σχετικά με τη λανθάνουσα φάση και τη φάση οριζοντίωσης, τη διάρκεια της δοκιμής, τον βαθμό απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και τον βαθμό απομάκρυνσης του οργανικού μέσου στη μονάδα-μάρτυρα, συνοδευόμενες από στατιστικά στοιχεία και δηλώσεις για τη βιοαποικοδομησιμότητα και την εγκυρότητα της δοκιμής,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων.

▼**M4**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Swisher R.D. (1987), «Surfactant Biodegradation», 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) German Government (1962), Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents, *Bundesgesetzblatt*, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter H.A. και King E.F. (1978a), WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter H.A. και King E.F. (1978b), The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants, *Wat. Res.* 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας.

(7) Κεφάλαιο Γ.12 του παρόντος παραρτήματος: Βιοαποικοδόμηση — τροποποιημένη δοκιμασία SCAS.

(8) Κεφάλαιο Γ.19 του παρόντος παραρτήματος: Υπολογισμός του συντελεστή προσρόφησης (K_{OC}) του εδάφους και της λάσπης των υπονόμων χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

(9) Gerike P. και Fischer W.K. (1979), A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotox. Env. Saf.* 3:157-173.

(10) Gerike P. και Fischer W.K. (1981), as (9), II Additional results and conclusions, *Ecotox. Env. Saf.* 5: 45-55.

(11) Painter H.A. και Bealing D. (1989), Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes, CEC Water Pollution Report 18, Eds. Jacobsen B.N., Muntau H., Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revised 2004), Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.

(13) Birch R.R. (1982), The biodegradability of alcohol ethoxylates, *XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.*: 33-48.

(14) Birch R.R. (1984), Biodegradation of noniomic surfactants, *J.A.O.C.S.* 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P., Fischer W.K. και Holtmann W. (1980), Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test, *Wat. Res.* 14: 753-758.

(16) Baumann U., Kuhn G. και Benz M. (1998), Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982), Assessment of biodegradability, Methods for the examination of waters and associated materials, pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998), Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds, Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

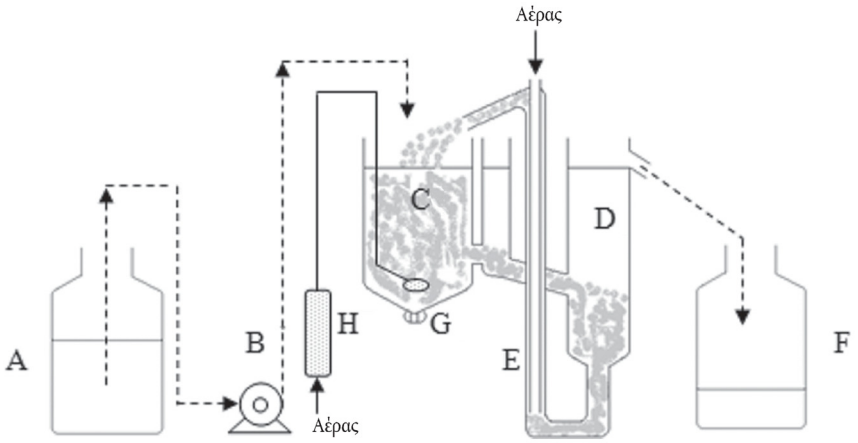
▼**M4**

Προσάρτημα 1

Σχήμα 1

Εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της βιοαποικοδομησιμότητας

Μονάδα Husmann



A. Δοχείο αποθήκευσης

B. Δοσομετρική αντλία

C. Θάλαμος αερισμού (χωρητικότητας 3L)

D. Δοχείο καθίζησης

E. Αεροκίνητη αντλία

F. Δοχείο συλλογής

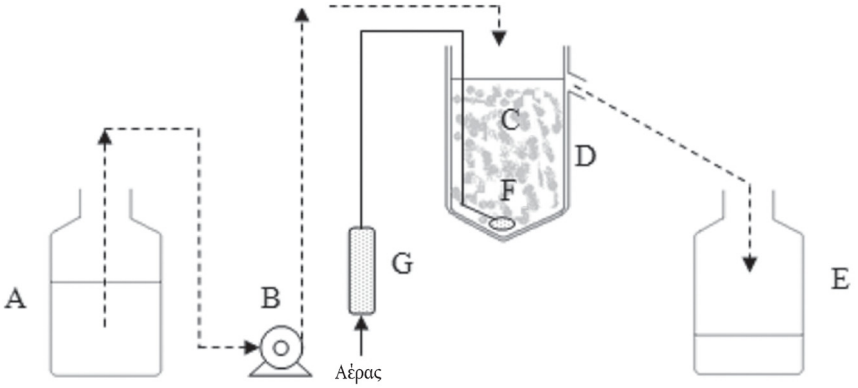
G. Αεριστήρας

H. Μετρητής ροής αέρα

Σχήμα 2

Εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της βιοαποικοδομησιμότητας

Πορώδες δοχείο



A. Δοχείο αποθήκευσης

B. Δοσομετρική αντλία

C. Πορώδες δοχείο αερισμού

D. Εξωτερικό αδιαπέραστο δοχείο

E. Δοχείο συλλογής

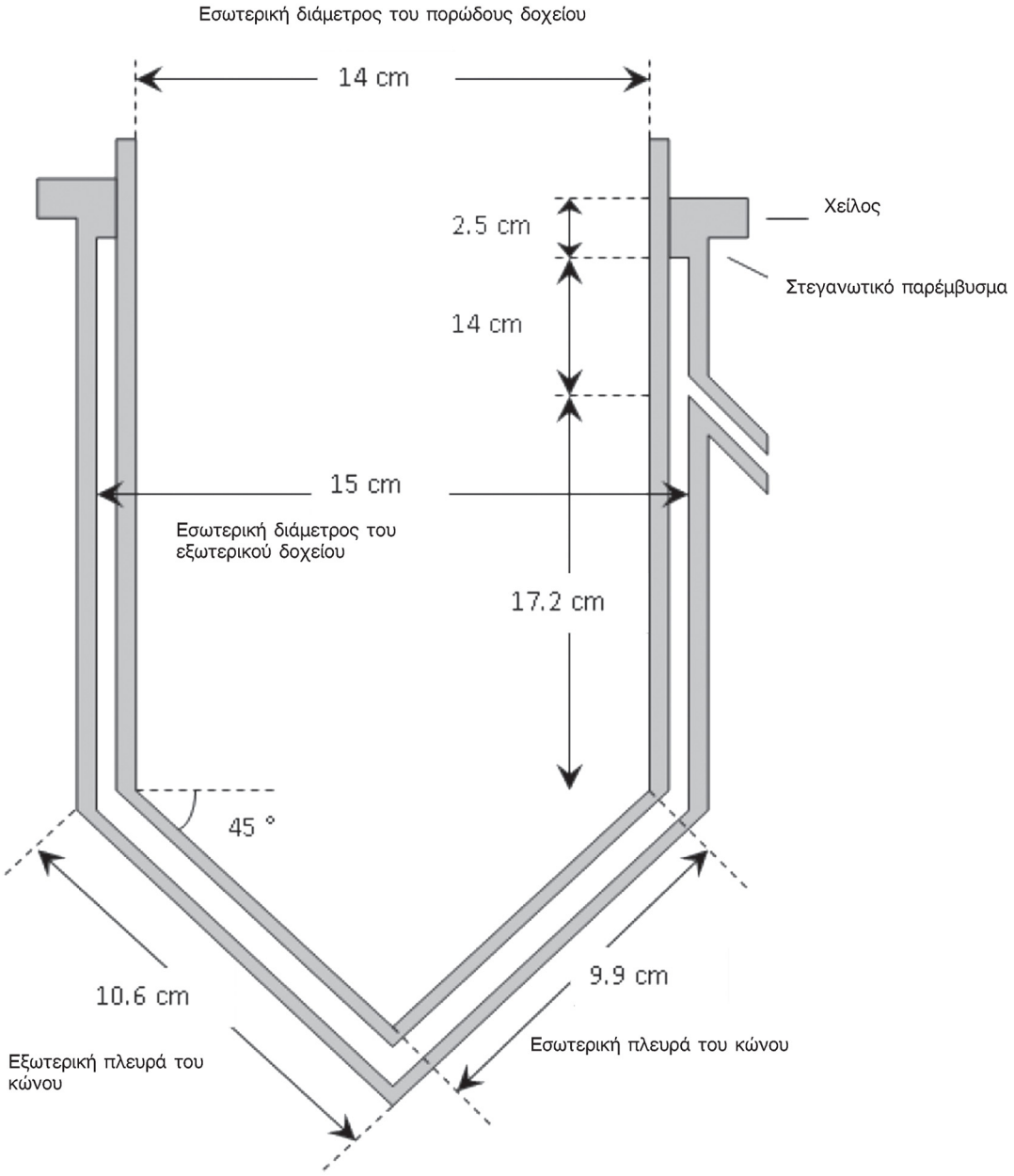
F. Διαχυτήρας

G. Μετρητής ροής αέρα

▼**M4**

Σχήμα 3

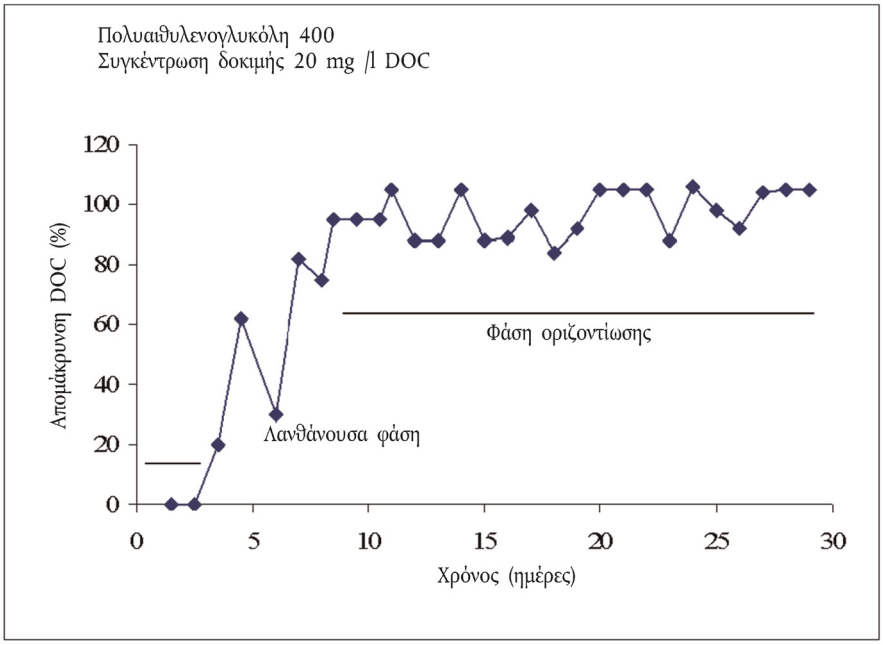
Στοιχεία πορώδους δοχείου αερισμού χωρητικότητας 3 λίτρων



▼**M4**

Προσάρτημα 2

Παράδειγμα καμπύλης απομάκρυνσης



▼M4

Προσάρτημα 3

[ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ]

ΣΥΖΕΥΞΗ ΤΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ ΔΟΚΙΜΗΣ

Σε μια προσπάθεια εξίσωσης των μικροβιακών πληθυσμών στις ιλύες της μονάδας δοκιμής, που δέχεται λύματα και την ελεγχόμενη χημική ουσία, και της μονάδας-μάρτυρα, που δέχεται μόνο λύματα, εισήχθη η καθημερινή ανταλλαγή ιλύος (1). Η διαδικασία αυτή ονομάστηκε σύζευξη και η μέθοδος είναι γνωστή ως συζευγμένες μονάδες. Η σύζευξη πραγματοποιούνταν αρχικά με μονάδες ενεργού ιλύος Husmann, αλλά έχει πραγματοποιηθεί και με μονάδες πορώδους δοχείου (2)(3). Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τα αποτελέσματα μεταξύ των μη συζευγμένων και των συζευγμένων μονάδων, είτε πρόκειται για μονάδες Husmann είτε για πορώδη δοχεία, και επομένως, η δαπάνη χρόνου και ενέργειας που απαιτείται για τη σύζευξη των μονάδων δεν προσφέρει κανένα πλεονέκτημα.

Οι ανταλλαγές ιλύος μπορεί να δίνουν την εντύπωση μιας σημαντικής απομάκρυνσης, δεδομένου ότι μέρος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μεταφέρεται και οι συγκεντρώσεις της στις εκροές των μονάδων δοκιμής και μάρτυρα εξισώνονται περισσότερο. Συνεπώς, πρέπει να χρησιμοποιούνται διορθωτικοί συντελεστές, οι οποίοι εξαρτώνται από το ανταλλασσόμενο κλάσμα και τον μέσο υδραυλικό χρόνο παραμονής. Έχουν δημοσιευθεί περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τον υπολογισμό (1).

Υπολογίζεται ο διορθωμένος βαθμός απομάκρυνσης του DOC ή COD με τη βοήθεια του γενικού τύπου:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\%$$

όπου

D_{tc} = διορθωμένη % απομάκρυνση DOC ή COD

D_t = προσδιορισθείσα % απομάκρυνση DOC ή COD

a = ανταλλασσόμενο κλάσμα του όγκου των μονάδων ενεργού ιλύος

r = μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής (ώρες)

Εάν, για παράδειγμα, ανταλλάσσεται ο μισός όγκο της δεξαμενής αερισμού (a = 0,5) και ο μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής είναι 6 ώρες, ο τύπος για τη διόρθωση είναι:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Fischer W., Gerike P., Holtmann W. (1975), Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test, *Wat. Res.* 9: 1131-1135.

(2) Painter H.A., Bealing D.J. (1989), Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138, στο: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18, Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter H.A., King E.F. (1978), Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability, Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Προσάρτημα 4

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ

Διεργασία από ελεγχόμενες χημικές ουσίες

1. Μια χημική ουσία (ή λύμα) μπορεί να μην αποικοδομηθεί ή απομακρυνθεί στη δοκιμή προσομοίωσης ή ακόμη και να έχει ανασταλτική επίδραση στους μικροοργανισμούς της ιλύος. Άλλες χημικές ουσίες βιοαποικοδομούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά είναι ανασταλτικές σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (όρμηση). Οι ανασταλτικές επιδράσεις ενδέχεται να έχουν αποκαλυφθεί σε προγενέστερο στάδιο ή μπορούν να προσδιοριστούν με τη διεξαγωγή δοκιμής τοξικότητας, κατά την οποία χρησιμοποιείται ένα εμβόλιο παρόμοιο ή πανομοιότυπο με το χρησιμοποιούμενο στη δοκιμή προσομοίωσης (1). Τέτοιες μέθοδοι είναι η αναστολή της πρόσληψης οξυγόνου [κεφάλαιο Γ.11 του παρόντος παραρτήματος (2) και πρότυπο ISO 8192(3)] και η αναστολή της ανάπτυξης οργανισμών της ιλύος [ISO 15522 (4)].

2. Στη δοκιμή προσομοίωσης, η αναστολή εκδηλώνεται, όταν η διαφορά ως προς τον διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC) ή το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο COD μεταξύ της εκροής από το δοχείο δοκιμής και της εκροής από το δοχείο-μάρτυρα είναι μεγαλύτερη από τον DOC που προστίθεται ως ελεγχόμενη χημική ουσία. Με άλλα λόγια, η ποσοστιαία απομάκρυνση DOC (και βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου BOD, χημικά απαιτούμενου οξυγόνου COD και/ή NH^+_4) του υπό επεξεργασία οργανικού μέσου θα μειώνεται λόγω της παρουσίας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στην περίπτωση αυτή, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, με μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέχρι το επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρείται αναστολή και, ίσως, με περαιτέρω μείωση της συγκέντρωσης έως ότου βιοαποικοδομηθεί η ελεγχόμενη χημική ουσία. Ωστόσο, εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία (ή το λύμα) έχει δυσμενείς επιδράσεις στη διεργασία σε όλες τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν, αυτό αποτελεί ένδειξη του ότι η βιολογική επεξεργασία της χημικής ουσίας είναι δύσκολη, αν όχι αδύνατη, αλλά ίσως είναι σκόπιμο να επαναληφθεί η δοκιμή με ενεργό ιλύ από διαφορετική πηγή και/ή να υποβληθεί η ιλύς σε σταδιακότερο εγκλιματισμό.

3. Αντιστρόφως, εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία απομακρυνθεί βιολογικά με την πρώτη προσπάθεια στη δοκιμή προσομοίωσης, η συγκέντρωσή της θα πρέπει να αυξηθεί, εάν απαιτείται να είναι γνωστή η πιθανή ανασταλτική ικανότητα της χημικής ουσίας.

4. Κατά την προσπάθεια προσδιορισμού βαθμών αναστολής δεν θα πρέπει να παραβλέπεται ότι ο πληθυσμός της ενεργού ιλύος μπορεί να μεταβληθεί, με αποτέλεσμα να αναπτύσσουν ενδεχομένως οι μικροοργανισμοί, με την πάροδο του χρόνου, ανοχή προς μια ανασταλτική χημική ουσία.

5. Υπολογισμός του βαθμού αναστολής:

   Το συνολικό ποσοστό απομάκρυνσης, R_o, των BOD, DOC, COD κ.λπ. μπορεί να υπολογιστεί για τις μονάδες δοκιμής και μάρτυρα από τον τύπο:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   όπου:

   I = συγκέντρωση BOD, DOC, COD κ.λπ., στην εισροή, για δοχεία δοκιμής ή μάρτυρα (mg/l)

   E = αντίστοιχες συγκεντρώσεις στις εκροές (mg/l).

   Οι τιμές I και E πρέπει να διορθώνονται για να λαμβάνεται υπόψη ο DOC που οφείλεται στην ελεγχόμενη χημική ουσία στις μονάδες δοκιμής, γιατί διαφορετικά οι υπολογισμοί του ποσοστού αναστολής θα είναι εσφαλμένοι.

▼**M4**

Ο βαθμός αναστολής που προκαλείται από την παρουσία της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

όπου:

R_c = ποσοστό απομάκρυνσης στα δοχεία-μάρτυρες

R_t = ποσοστό απομάκρυνσης στα δοχεία δοκιμής

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Reynolds L. et al. (1987), Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability, *Chemosphere* 16: 2259.

(2) Κεφάλαιο Γ.11 του παρόντος παραρτήματος: Βιοαποικοδόμηση — Ενεργός ιλύς: έλεγχος αναστολής της αναπνοής.

(3) ISO 8192 (2007) Water quality — Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality — Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Προσάρτημα 5

Δυσδιάλυτες στο νερό ελεγχόμενες χημικές ουσίες — πτητικές χημιές ουσίες

Δυσδιάλυτες στο νερό χημικές ουσίες

Λίγες είναι οι εκθέσεις που έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την υποβολή δυσδιάλυτων και αδιάλυτων στο νερό χημικών ουσιών σε δοκιμές προσομοίωσης της επεξεργασίας λυμάτων (1)(2)(3).

Δεν υπάρχει ενιαία μέθοδος διασποράς της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που να εφαρμόζεται σε όλες τις αδιάλυτες χημικές ουσίες. Δύο από τους τέσσερις τύπους μεθόδου που περιγράφονται στο πρότυπο ISO 10634 (4) φαίνονται κατάλληλοι για την προσπάθεια διασποράς ελεγχόμενων χημικών ουσιών για δοκιμές προσομοίωσης: πρόκειται για τη χρήση γαλακτωματοποιητών και/ή υπερηχητικής ενέργειας. Θα πρέπει να αποδεικνύεται η σταθερότητα της προκύπτουσας διασποράς τουλάχιστον για 24 ώρες. Στη συνέχεια, κατάλληλα σταθεροποιημένες διασπορές, που περιέχονται σε συνεχώς αναδευόμενο δοχείο (παράγραφος 38) τροφοδοτούνται στη δεξαμενή αερισμού χωριστά από τα οικιακά (ή συνθετικά) λύματα.

Εάν οι διασπορές είναι σταθερές, διερευνάται ο τρόπος με τον οποίο μπορεί να προσδιοριστεί η ελεγχόμενη χημική ουσία σε μορφή διεσποράς. Οι πιθανότητες να είναι κατάλληλος ο DOC είναι λίγες και, επομένως, θα πρέπει να καθορίζεται ειδική αναλυτική μέθοδος για την ελεγχόμενη χημική ουσία, με δυνατότητα εφαρμογής στις εκροές, στα στερεά εκροών και στην ενεργό ιλύ. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η πορεία της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην προσομοίωση της διεργασίας ενεργού ιλύος, σε υγρή και στερεή φάση. Ως εκ τούτου, μπορεί να καθοριστεί ένα «ισοζύγιο μάζας» για να κριθεί αν η ελεγχόμενη χημική ουσία βιοαποικοδομήθηκε. Ωστόσο, αυτό θα υποδήλωνε μόνο πρωτοβάθμια βιοαποικοδόμηση. Η απόδειξη της τελικής βιοαποικοδόμησης πρέπει να επιχειρείται με τη διεξαγωγή μιας αναπνευσιομετρικής δοκιμής άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας [κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος (5), μέθοδοι Γ, Ζ, Δ], με τη χρήση ιλύος που έχει εκτεθεί στην ελεγχόμενη χημική ουσία κατά τη δοκιμή προσομοίωσης ως εμβολίου.

Πτητικές χημικές ουσίες

Η εφαρμογή των προσομοιώσεων επεξεργασίας λυμάτων σε πτητικές χημικές ουσίες είναι τόσο αμφισβητήσιμη, όσο και προβληματική. Όπως και με τις δυσδιάλυτες στο νερό ελεγχόμενες χημικές ουσίες, έχουν δημοσιευθεί ελάχιστες εκθέσεις που περιγράφουν δοκιμές προσομοίωσης με πτητικές χημικές ουσίες. Ένας συμβατικός τύπος συσκευής πλήρους ανάμειξης προσαρμόζεται με τη σφράγιση των δεξαμενών αερισμού και καθίζησης, τη μέτρηση και τον έλεγχο της ροής του αέρα με μετρητές ροής και με τη διοχέτευση του αερίου εξόδου μέσω παγίδων για τη συλλογή των πτητικών οργανικών ουσιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, χρησιμοποιείται αντλία κενού για να διαβιβάσει το αέριο εξόδου μέσω κρυοπαγίδας ή παγίδας εκδίωξης-παγίδευσης που περιέχει Tenax και πυριτική πηκτή, για αεριοχρωματογραφικές αναλύσεις. Η ελεγχόμενη χημική ουσία που υπάρχει στην παγίδα μπορεί να προσδιοριστεί με ανάλυση.

Η δοκιμή διεξάγεται σε δύο μέρη. Οι μονάδες λειτουργούν πρώτα χωρίς ιλύ, αλλά με άντληση των συνθετικών λυμάτων συν την ελεγχόμενη χημική ουσία στη δεξαμενή αερισμού. Για μερικές ημέρες συλλέγονται δείγματα εισροών, εκροών και αερίων εξόδου και αναλύονται για την ανίχνευση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Από τα συλλεγόμενα δεδομένα μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό (R_{vs}) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που αφαιρείται από το σύστημα.

Στη συνέχεια, εκτελείται η κανονική βιολογική δοκιμή (με ιλύ) υπό συνθήκες λειτουργίας πανομοιότυπες με εκείνες της μελέτης αφαίρεσης. Εκτελούνται επίσης μετρήσεις DOC ή COD προκειμένου να εξακριβώνεται η αποτελεσματική λειτουργία των μονάδων. Διενεργούνται περιστασιακές αναλύσεις για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή, στην εκροή και στο αέριο εξόδου κατά το πρώτο μέρος της δοκιμής, ενώ μετά τον εγκλιματισμό οι αναλύσεις είναι συχνότερες. Από τα δεδομένα σε σταθερή κατάσταση μπορεί και πάλι να υπολογιστεί το ποσοστό απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (R_T) από την υγρή φάση με όλες τις διεργασίες (φυσικές και βιολογικές), καθώς και το ποσοστό (R_V) που αφαιρείται από το σύστημα.

▼**M4**

Υπολογισμός:

α) Στη μη βιολογική δοκιμή, το ποσοστό (R_{VP}) του υπό δοκιμή υλικού που αφαιρείται από το σύστημα μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

όπου

R_{VP} = απομάκρυνση της χημικής ουσίας με εξάτμιση (%),

S_{VP} = ελεγχόμενη χημική ουσία που έχει συλλεγεί σε παγίδα, εκφρασμένη ως ισοδύναμη συγκέντρωση σε υγρή φάση (mg/l),

S_{IP} = συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή (mg/l).

β) Στη βιολογική δοκιμή, το ποσοστό (R_V) του υπό δοκιμή υλικού που αφαιρείται από το σύστημα μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

όπου

R_V = απομάκρυνση της χημικής ουσίας με εξάτμιση κατά τη βιολογική δοκιμή (%),

S_V = ελεγχόμενη χημική ουσία που έχει συλλεγεί σε παγίδα κατά τη βιολογική δοκιμή, εκφρασμένη ως ισοδύναμη συγκέντρωση σε υγρή εισροή (mg/l),

S_I = συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή (mg/l).

γ) Στη βιολογική δοκιμή, το ποσοστό (R_T) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που απομακρύνεται με όλες τις διεργασίες δίδεται από τον τύπο:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

όπου

S_E = συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην (υγρή) εκροή (mg/l).

δ) Επομένως, το ποσοστό (R_{BA}) που απομακρύνεται αθροιστικά με βιοαποικοδόμηση και προσρόφηση μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Θα πρέπει να διεξάγονται χωριστές δοκιμές για να διαπιστώνεται κατά πόσον η ελεγχόμενη χημική ουσία προσροφάται. Εάν η απάντηση είναι καταφατική, μπορεί να γίνει περαιτέρω διόρθωση.

ε) Η σύγκριση μεταξύ των ποσοστών της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που αφαιρούνται από τα συστήματα βιολογικής (R_v) και μη βιολογικής δοκιμής (R_{vp}) υποδηλώνει το συνολικό αποτέλεσμα της βιολογικής επεξεργασίας όσον αφορά τις ατμοσφαιρικές εκπομπές της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

Παράδειγμα: Βενζόλιο

Χρόνος παραμονής ιλύος = 4 ημέρες

Συνθετικά λύματα, χρόνος παραμονής = 8 ώρες

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 μg/l

▼**M4**

Άρα,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % και R_{BA} = 85 %.

Θεωρείται ότι το βενζόλιο δεν προσροφήθηκε στην ιλύ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Horn J.A., Moyer J.E., Hale J.H. (1970), Biological degradation of tertiary butyl alcohol, Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P., Chudoba J. (1990), Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover E.L., Kincannon D.F. (1983), Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(5) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας.

▼M4

Προσάρτημα 6

Επίδραση του χρόνου παραμονής ιλύος (SRT) στην επεξεργασιμότητα χημικών ουσιών

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η μέθοδος που περιγράφεται στο κυρίως κείμενο προορίζεται για την εξακρίβωση του κατά πόσον οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες (συνήθως αυτές που είναι γνωστό ότι είναι εγγενώς, αλλά όχι ευκόλως, βιοαποικοδομήσιμες) μπορούν να βιοαποικοδομηθούν εντός των ορίων που επιβάλλουν οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστιαία απομάκρυνση και ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση. Οι συνθήκες λειτουργίας των μονάδων ενεργού ιλύος και η επιλογή εισροής καθιστούν δυνατές σχετικά μεγάλες διακυμάνσεις της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίες στις εκροές. Οι δοκιμές διεξάγονται μόνο σε μία ονομαστική συγκέντρωση στερεών ιλύος ή σε έναν ονομαστικό χρόνο παραμονής της ιλύος (SRT) και τα περιγραφόμενα συστήματα περίσσειας ιλύος μπορούν να οδηγήσουν στη σημαντική διακύμανση της τιμής του SRT κατά τη δοκιμή, τόσο από ημέρα σε ημέρα όσο και κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας.

2. Στην παρούσα παραλλαγή (1)(2) ο SRT ελέγχεται εντός πολύ στενότερων ορίων ανά 24ωρο (όπως ακριβώς συμβαίνει σε μεγάλη κλίμακα), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα σταθερότερη συγκέντρωση στις εκροές. Συνιστώνται τα οικιακά λύματα, διότι εξασφαλίζουν συνεπέστερα και υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης. Διερευνώνται επίσης οι επιδράσεις μιας σειράς τιμών SRT, ενώ σε μια πιο διεξοδική μελέτη μπορούν να προσδιοριστούν οι επιδράσεις ενός εύρους θερμοκρασιών στη συγκέντρωση στις εκροές.

3. Δεν έχει υπάρξει ακόμη γενική συμφωνία ως προς τα κινητικά μοντέλα που λειτουργούν όταν χημικές ουσίες βιοαποικοδομούνται υπό συνθήκες επεξεργασίας λυμάτων. Επιλέχθηκε το μοντέλο Monod της βακτηριακής ανάπτυξης και της χρησιμοποίησης υποστρώματος (1)(2) για εφαρμογή στα συλλεγόμενα δεδομένα, καθώς η μέθοδος προορίζεται για εφαρμογή μόνο σε χημικές ουσίες που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις τους στα λύματα να υπερβαίνουν το 1 mg/l. Η εγκυρότητα του απλοποιημένου μοντέλου και οι παραδοχές που έγιναν αποδείχθηκαν με τη χρήση μιας σειράς αιθοξυλεστέρων αλκοόλης με διάφορους βαθμούς πρωτοβάθμιας βιοαποικοδόμησης (2)(3).

Σημείωση: Η παρούσα παραλλαγή ακολουθεί πιστά μεγάλο μέρος του κειμένου της παρούσας μεθόδου δοκιμών Γ.10-Α και κατωτέρω παρατίθενται μόνο οι λεπτομέρειες που διαφέρουν.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

4. Μονάδες πορώδους δοχείου ενεργού ιλύος, σχεδιασμένες με σκοπό να διευκολύνουν τη (σχεδόν) συνεχή απόρριψη ανάμεικτου υγρού που επιτρέπει τον ακριβέστατο έλεγχο του χρόνου παραμονής της ιλύος (SRT ή θ_s), λειτουργούν χωρίς σύζευξη σε ένα εύρος χρόνων παραμονής ιλύος (SRT) και, προαιρετικά, σε ένα εύρος θερμοκρασιών. Ο χρόνος παραμονής κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 2 και 10 ημερών και η θερμοκρασία μεταξύ 5 και 20 °C. Τα λύματα, κατά προτίμηση οικιακά, και ένα διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας τροφοδοτούνται χωριστά στις μονάδες με ρυθμό που επιτρέπει να επιτευχθούν ο απαιτούμενος χρόνος παραμονής λυμάτων (3 έως 6 ώρες) και η απαιτούμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή. Για λόγους σύγκρισης, λειτουργούν παράλληλα μονάδες-μάρτυρες που δεν δέχονται την ελεγχόμενη χημική ουσία.

5. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι τύποι συσκευών, αλλά πρέπει να δίδεται μεγάλη προσοχή στην επίτευξη ικανοποιητικού ελέγχου του SRT. Για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιούνται εγκαταστάσεις που περιλαμβάνουν δεξαμενή καθίζησης, ενδέχεται να είναι απαραίτητο ένα περιθώριο για απώλειες στερεών μέσω των εκροών της εγκατάστασης. Περαιτέρω, πρέπει να λαμβάνονται ειδικές προφυλάξεις ώστε να αποφεύγονται σφάλματα που οφείλονται στη μεταβλητότητα της ποσότητας ιλύος στη δεξαμενή καθίζησης.

▼M4

6. Οι μονάδες λειτουργούν σε κάθε επιλεγμένο σύνολο συνθηκών και, αφού επιτευχθεί ισορροπία, λαμβάνονται για περίοδο περίπου τριών εβδομάδων οι μέσες συγκεντρώσεις σταθερής κατάστασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στις εκροές και, προαιρετικά, του DOC. Εκτός από την εκτίμηση της ποσοστιαίας απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και, προαιρετικά, του DOC, εκφράζεται με γραφική παράσταση η σχέση μεταξύ των συνθηκών λειτουργίας της εγκατάστασης και της συγκέντρωσης στην εκροή. Από τη σχέση αυτή είναι δυνατόν να υπολογιστούν προσωρινές κινητικές σταθερές και να προβλεφθούν οι συνθήκες υπό τις οποίες η ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να υποστεί επεξεργασία.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

7. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 12 και 13 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ

8. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 14 και 15 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Εφαρμόζεται η παράγραφος 16 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

10. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 17 και 18 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εξοπλισμός

11. Κατάλληλη μονάδα είναι το τροποποιημένο σύστημα πορώδους δοχείου (προσάρτημα 6.1). Αποτελείται από ένα εσωτερικό δοχείο (ή επένδυση) που είναι κατασκευασμένο από πορώδες πολυπροπυλένιο πάχους 3,2 mm, με πόρους μεγέθους περίπου 90 μm, του οποίου η συναρμογή έχει συγκολληθεί μετωπικά. (Πρόκειται για πιο ανθεκτική μονάδα από αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 21 του παρόντος κεφαλαίου Γ.10-Α). Η επένδυση τοποθετείται σε ένα εξωτερικό αδιαπέραστο δοχείο από πολυαιθυλένιο, το οποίο αποτελείται από δύο μέρη: μια κυκλική βάση, με οπές για δύο γραμμές αέρα και μια γραμμή περίσσειας ιλύος, και έναν άνω κύλινδρο, ο οποίος βιδώνεται στη βάση και φέρει στόμιο τοποθετημένο κατά τρόπο ώστε το πορώδες δοχείο να έχει γνωστό όγκο (3 L). Μία από τις γραμμές αέρα είναι εφοδιασμένη με διαχυτήρα, ενώ η δεύτερη είναι ανοικτού τύπου και σχηματίζει ορθή γωνία με τον διαχυτήρα του δοχείου. Το σύστημα αυτό δημιουργεί τον αναγκαίο στροβιλισμό ώστε να εξασφαλίζεται η πλήρης ανάμειξη του περιεχομένου του δοχείου, παράλληλα με την επίτευξη συγκεντρώσεων διαλυμένου οξυγόνου άνω των 2 mg/l.

12. Ο κατάλληλος αριθμός μονάδων διατηρείται σε ελεγχόμενες θερμοκρασίες μεταξύ 5 και 20 °C (± 1 °C), είτε σε υδατόλουτρα είτε σε αίθουσες σταθερής θερμοκρασίας. Απαιτούνται αντλίες για την τροφοδοσία των δοχείων αερισμού με το διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και τα καθιζημένα λύματα με τις απαιτούμενες παροχές (0-1,0 ml/λεπτό και 0-25 ml/λεπτό, αντίστοιχα), καθώς και μια τρίτη αντλία για την αφαίρεση της περίσσειας ιλύος από τα δοχεία αερισμού. Η απαραίτητη πολύ χαμηλή παροχή περίσσειας ιλύος επιτυγχάνεται με τη χρήση αντλίας ρυθμισμένης σε υψηλότερη παροχή, η οποία λειτουργεί διακεκομμένα με τη βοήθεια χρονοδιακόπτη, π.χ. λειτουργία επί 10 δευτερόλεπτα ανά λεπτό, παροχή αντλίας 3 ml/λεπτό, παροχή περίσσειας ιλύος 0,5 ml/λεπτό.

Συσκευή διήθησης ή φυγόκεντρος

13. Εφαρμόζεται η παράγραφος 23 του κεφαλαίου Γ.10-Α

Αναλυτικός εξοπλισμός

14. Εφαρμόζεται η παράγραφος 24 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Νερό

▼M4

15. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 25 και 26 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Οργανικό μέσο

16. Εφαρμόζεται η παράγραφος 27 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Συνθετικά λύματα

17. Εφαρμόζεται η παράγραφος 28 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Οικιακά λύματα

18. Εφαρμόζεται η παράγραφος 29 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Ενεργός ιλύς

19. Εφαρμόζεται η παράγραφος 30 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Διαλύματα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

20. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 31 και 32 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρασκευή του εμβολίου

21. Εφαρμόζεται μόνο η παράγραφος 34 του κεφαλαίου Γ.10-Α — χρήση ενεργού ιλύος (περίπου 2,5 g/l).

Αριθμός μονάδων δοκιμής

22. Για μια απλή δοκιμή, δηλαδή για τη μέτρηση της ποσοστιαίας απομάκρυνσης, απαιτείται μόνο μία τιμή SRT, αλλά προκειμένου να αποκτηθούν απαραίτητα δεδομένα για τον υπολογισμό προσωρινών κινητικών σταθερών απαιτούνται 4 ή 5 τιμές SRT. Συνήθως, επιλέγονται τιμές μεταξύ 2 και 10 ημερών. Στην πράξη, εξυπηρετεί η διεξαγωγή μιας δοκιμής με 4 ή 5 χρόνους SRT ταυτοχρόνως σε μία θερμοκρασία. Σε εκτεταμένες μελέτες χρησιμοποιούνται οι ίδιες τιμές SRT, ή ενδεχομένως ένα διαφορετικό εύρος τιμών σε άλλες θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 5 και 20 °C. Για την πρωτοβάθμια βιοαποικοδόμηση (η κύρια χρήση) απαιτείται κατά κανόνα μόνο μία μονάδα ανά σύνολο συνθηκών. Ωστόσο, για την τελική βιοαποικοδομησιμότητα απαιτείται μια μονάδα-μάρτυρας για κάθε σύνολο συνθηκών, η οποία δέχεται λύματα, αλλά όχι την ελεγχόμενη χημική ουσία. Εάν θεωρείται ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι παρούσα στα χρησιμοποιούμενα λύματα, θα είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθούν μονάδες-μάρτυρες κατά την εκτίμηση της πρωτοβάομιας βιοαποικοδόμησης και την απαραίτητη διόρθωση στους υπολογισμούς.

Τροφοδοσία του οργανικού μέσου και της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

23. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 36 έως 39 του κεφαλαίου Γ.10-Α, αλλά πρέπει να σημειωθεί ότι το διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας προστίθεται χωριστά και χρησιμοποιούνται διάφορες παροχές περίσσειας ιλύος. Παρακολουθούνται επίσης συχνά και, εφόσον είναι αναγκαίο, ρυθμίζονται σε ± 10 %, οι παροχές εισροής, εκροής και περίσσειας ιλύος, π.χ. δύο φορές ημερησίως. Εάν, κατά τη χρήση οικιακών λυμάτων, ανακύψουν δυσκολίες στις αναλυτικές μεθόδους, η δοκιμή διεξάγεται με συνθετικά λύματα, αλλά πρέπει να εξακριβώνεται ότι προκύπτουν συγκρίσιμα δεδομένα κινητικής από τα διαφορετικά μέσα.

Χειρισμός των μονάδων ενεργού ιλύος

24. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 40 έως 43 του κεφαλαίου Γ.10-Α, αλλά ο χρόνος παραμονής ιλύος ελέγχεται μόνο με «σταθερή» περίσσεια ιλύος.

Δειγματοληψία και ανάλυση

25. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 44 έως 50 του κεφαλαίου Γ.10-Α, με τη διαφορά ότι πρέπει να προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και, προαιρετικά, του DOC, ενώ δεν πρέπει να χρησιμοποιείται το COD.

▼M4

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

26. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 52 και 54 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Έκφραση των αποτελεσμάτων της δοκιμής

27. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 56 έως 62 του κεφαλαίου Γ.10-Α.

Υπολογισμός των κινητικών σταθερών

28. Η παράθεση της μέσης συγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εκροή και η εξήγηση της μεταβολής της ανάλογα με τις συνθήκες λειτουργίας της εγκατάστασης είναι ρεαλιστικότερη από την παράθεση της ποσοστιαίας πρωτοβάθμιας βιοαποικοδόμησης. Αυτό μπορεί να γίνει με βάση την εξίσωση [6] του προσαρτήματος 6.2, η οποία μπορεί να αποδώσει τιμές K_S, μ_m και θ_{SC}, τον κρίσιμο χρόνο παραμονής της ιλύος.

(Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να ληφθούν κατά προσέγγιση τιμές K_S και μm με τη χρήση ενός απλού υπολογιστικού προγράμματος για την προσαρμογή της θεωρητικής καμπύλης που υπολογίζεται από την εξίσωση 2 (προσάρτημα 6.2) στις πειραματικές τιμές. Παρά το γεγονός ότι κανένα δεδομένο διάλυμα δεν είναι μοναδικό, μπορεί να ληφθεί μια εύλογη προσέγγιση των K_S και μ_m.)

Μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων

29. Αποτελεί κοινή εμπειρία ότι λαμβάνονται μεταβλητές τιμές των κινητικών παραμέτρων για τις επιμέρους χημικές ουσίες. Πιστεύεται ότι οι συνθήκες υπό τις οποίες έχει αναπτυχθεί η ιλύς, καθώς και οι συνθήκες που επικρατούν κατά τη διεξαγόμενη δοκιμή (όπως στην παράγραφο 5 και σε άλλες δοκιμές), επηρεάζουν σημαντικά τις τιμές που προκύπτουν. Μια πτυχή αυτής της μεταβλητότητας έχει συζητηθεί από τους Grady et al. (4), οι οποίοι έχουν προτείνει τους όρους «υφιστάμενη» και «εγγενής» για τις δύο ακραίες συνθήκες που αντιπροσωπεύουν τα όρια της φυσιολογικής κατάστασης στα οποία μπορεί να φθάσει μια καλλιέργεια κατά τη διάρκεια ενός πειράματος κινητικής. Εάν δεν ελιναι δυνατή η μεταβολή της κατάστασης κατά τη διάρκεια της δοκιμής, οι τιμές των κινητικών παραμέτρων εκφράζουν τις συνθήκες του περιβάλλοντος από το οποίο ελήφθησαν οι μικροοργανισμοί. Οι τιμές αυτές ονομάζονται «υφιστάμενες» ή τρέχουσες. Στον αντίποδα, εάν οι συνθήκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιτρέπουν την πλήρη ανάπτυξη του πρωτεϊνοσυνθετικού συστήματος που καθιστά δυνατό τον μέγιστο δυνατό ρυθμό ανάπτυξης, οι προκύπτουσες κινητικές παράμετροι καλούνται «εγγενείς» και εξαρτώνται μόνο από το είδος του υποστρώματος και τους τύπους των βακτηρίων της καλλιέργειας. Ενδεικτικά, υφιστάμενες τιμές θα λαμβάνονται με τη διατήρηση του λόγου της συγκέντρωσης του υποστρώματος προς τους σχετικούς μικροοργανισμούς (S_o/X_o) σε χαμηλά επίπεδα, π.χ. 0,025, ενώ εγγενείς τιμές προκύπτουν όταν ο λόγος αυτός είναι υψηλός, π.χ. τουλάχιστον 20. Και στις δύο περιπτώσεις, η τιμή S_o θα πρέπει να είναι ίση ή να υπερβαίνει τη σχετική τιμή Ks, της σταθεράς ημικορεσμού.

30. Η μεταβλητότητα και άλλες πτυχές της κινητικής της βιοαποικοδόμησης συζητήθηκαν σε πρόσφατη ημερίδα της SETAC (5). Από τις σχετικές μελέτες, δημοσιευμένες και υπό δημοσίευση, αναμένεται σύντομα να διαμορφωθεί σαφέστερη εικόνα της κινητικής στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, ώστε να καταστεί δυνατή η καλύτερη ερμηνεία των υπαρχόντων δεδομένων και να προταθούν καταλληλότερα σχέδια για μελλοντικές μεθόδους δοκιμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Birch R.R. (1982), The biodegradability of alcohol ethoxylates, *XIII Jornado Com. Espanol Deterg.*: 33-48.

(2) Birch R.R. (1984), Biodegradation of nonionic surfactants, *J.A.O.C.S.* 61(2): 340-343.

(3) Birch R.R. (1991), Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 50: 411-422.

▼**M4**

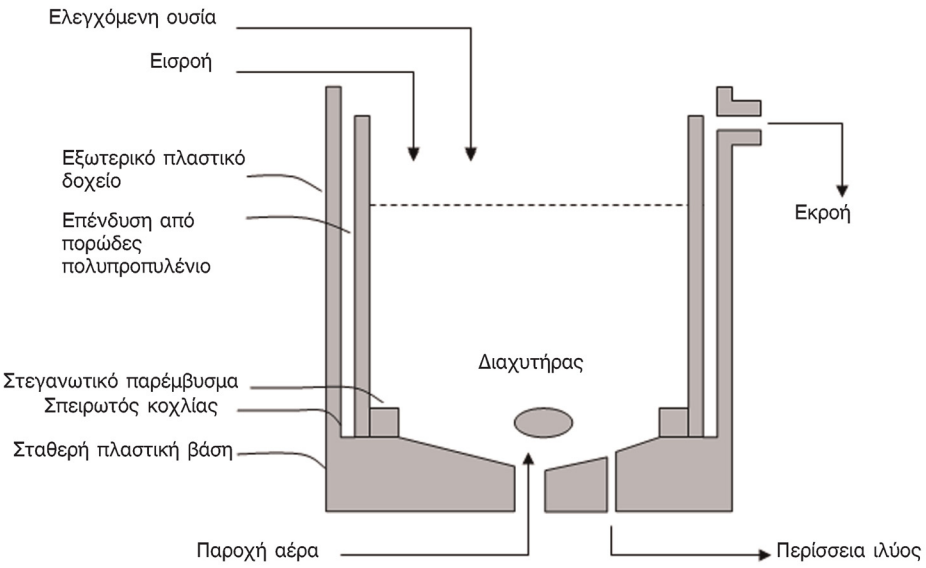
(4) Grady C.P.L., Smets B.F. και Barbeau D.S. (1996), Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology, *Wat. Res.* 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997), Workshop at Port Sunlight, UK, Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W., 4-6th Sept. 1996, SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

Προσάρτημα 6.1

Πορώδες δοχείο με έλεγχο του χρόνου παραμονής της ιλύος (SRT)



▼M4

Προσάρτημα 6.2

Υπολογισμός των κινητικών σταθερών

1. Με την παραδοχή ότι εφαρμόζεται η κινητική Monod και λαμβάνοντας υπόψη το ισοζύγιο μάζας των ενεργών στερεών και του υποστρώματος σε όλο το σύστημα ενεργού ιλύος (1), μπορούν να ληφθούν οι ακόλουθες εκφράσεις σταθερής κατάστασης:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

ή

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

όπου

S_1 = συγκέντρωση του υποστρώματος στην εκροή, (mg/l)

K_S = σταθερά ημικορεσμού, συγκέντρωση στην οποία $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (ημέρα $^{-1}$)

μ_m = μέγιστη τιμή του μ_m (ημέρα $^{-1}$)

K_d = ειδική ταχύτητα διάσπασης των ενεργών στερεών (ημέρα $^{-1}$)

θ_S = μέσος χρόνος παραμονής της ιλύος, SRT (ημέρα)

Η εξέταση της εξίσωσης αυτής οδηγεί στα ακόλουθα συμπεράσματα:

i) Η συγκέντρωση στην εκροή είναι ανεξάρτητη από την αντίστοιχη στην εισροή (S_0). Ως εκ τούτου, η ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση μεταβάλλεται ανάλογα με τη συγκέντρωση στην εισροή, S_0.

ii) Η μόνη παράμετρος ελέγχου της εγκατάστασης που επηρεάζει τη S_1 είναι ο χρόνος παραμονής της ιλύος, θ_S.

iii) Για δεδομένη συγκέντρωση στην εισροή, S_0, θα υπάρχει ένας κρίσιμος χρόνος παραμονής της ιλύος, έτσι ώστε:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

όπου

θ_{SC} = κρίσιμος χρόνος παραμονής της ιλύος, κάτω από τον οποίο οι σχετικοί μικροοργανισμοί θα απορρίπτονται από την εγκατάσταση.

iv) Δεδομένου ότι οι άλλες παράμετροι της εξίσωσης (2) συνδέονται με την κινητική ανάπτυξης, η θερμοκρασία είναι πιθανόν να επηρεάσει το επίπεδο υποστρώματος στην εκροή, ενώ η κρίσιμη ηλικία της ιλύος, δηλαδή ο χρόνος παραμονής της που απαιτείται για να ληφθεί ένας ορισμένος βαθμός επεξεργασίας, θα αυξάνεται με τη μείωση της θερμοκρασίας.

2. Από το ισοζύγιο μάζας των στερεών στο σύστημα πορώδους δοχείου και με την παραδοχή ότι η συγκέντρωση στερεών στην εκροή της εγκατάστασης, X_2 είναι χαμηλή σε σύγκριση με εκείνη στο δοχείο αερισμού, X_1, ο χρόνος παραμονής της ιλύος

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

και

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

όπου

V = όγκος του δοχείου αερισμού (l)

X_1 = συγκέντρωση στερεών στο δοχείο αερισμού (mg/l)

X_2 = συγκέντρωση στερεών στην εκροή (mg/l)

Q_0 = παροχή της εισροής (l/ημέρα)

Q_1 = παροχή της περίσσειας ιλύος (l/ημέρα)

Συνεπώς, είναι δυνατόν να ρυθμιστεί ο χρόνος παραμονής της ιλύος σε οποιαδήποτε προεπιλεγμένη τιμή μέσω του ελέγχου της παροχής της περίσσειας ιλύος, Q_1.

Συμπεράσματα:

3. Κύριος σκοπός της δοκιμής είναι συνεπώς να καταστήσει δυνατή την πρόβλεψη της συγκέντρωσης στις εκροές και, κατ' επέκταση, των επιπέδων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στα ύδατα υποδοχής.

4. Με γραφική παράσταση της S_1 συναρτήσει του θ_S, μπορεί μερικές φορές να αξιολογηθεί εύκολα ο κρίσιμος χρόνος παραμονής της ιλύος, θ_{SC}, π.χ. καμπύλη 3 στο σχήμα 1. Όταν αυτό δεν είναι εφικτό, ο θ_{SC}, καθώς και προσεγγιστικές τιμές των μ_m και K_S, μπορούν να υπολογιστούν με γραφική παράσταση της S_1, συναρτήσει του $S_1 \cdot \theta_S$.

Η αναδιάταξη της εξίσωσης (1) δίνει

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Εάν το K_d είναι μικρό, τότε $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$ και η εξίσωση [5] γίνεται:

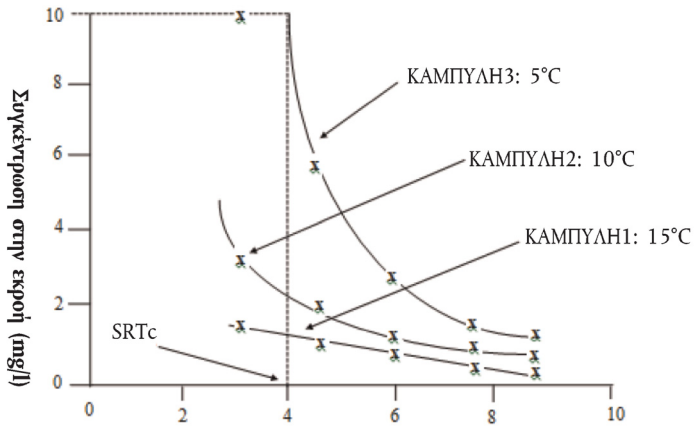
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Επομένως, η γραφική παράσταση πρέπει να είναι ευθεία γραμμή (βλέπε σχήμα 2) με κλίση $1/\mu_m$ και με σημείο τομής K_S/μ_m, επίσης $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼**M4**

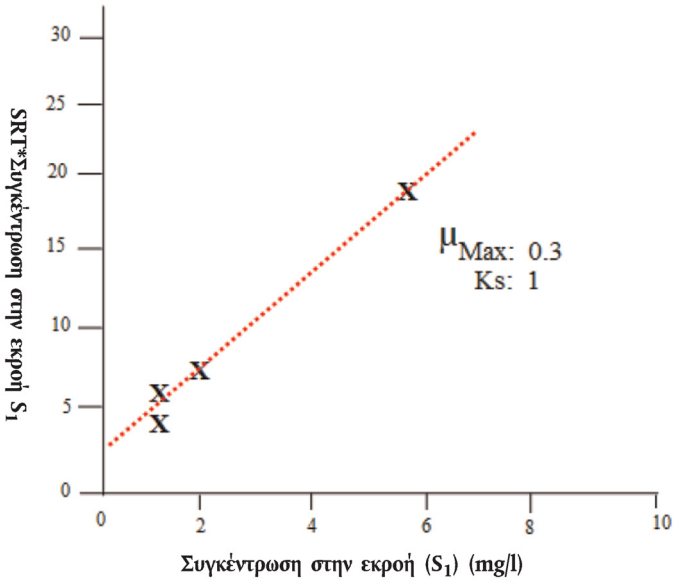
Σχήμα 1

Τρεις θερμοκρασίες, πέντε χρόνοι SRT



Σχήμα 2

Γραμμή παλινδρόμησης SRT· S_1 συναρτήσει του S_1 σε T = 5 °C



Γλωσσάριο:

Συγκέντρωση στην εκροή

Καμπύλη

▼M4

Προσάρτημα 7

ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΧΑΜΗΛΟ ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ (μg/l)

1. Υπό κανονικές συνθήκες, πολλές χημικές ουσίες υπάρχουν στο υδάτινο περιβάλλον, ακόμη και στα λύματα, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (μg/l). Σε τέτοιες συγκεντρώσεις, σπανίως χρησιμεύουν ως πρωτογενή υποστρώματα για ανάπτυξη, αλλά είναι πιθανότερο να αποικοδομούνται ως δευτερογενή υποστρώματα χωρίς ανάπτυξη, ταυτόχρονα με ποικίλες φυσικές χημικές ενώσεις άνθρακα. Κατά συνέπεια, οι αποικοδομήσεις αυτών των χημικών ουσιών δεν ταιριάζουν με το μοντέλο που περιγράφεται στο προσάρτημα 6. Υπάρχουν πολλά μοντέλα που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν και, υπό τις συνθήκες που επικρατούν στα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων, ενδέχεται να είναι λειτουργικά περισσότερα από ένα ταυτόχρονα. Για τη λύση του προβλήματος αυτού θα χρειαστεί πολύ περισσότερη έρευνα.

2. Εν τω μεταξύ, είναι δυνατόν να ακολουθηθεί η διαδικασία που περιγράφεται στο κυρίως κείμενο (κεφάλαιο Γ.10-Α), αλλά μόνο για την πρωτοβάθμια βιοαποικοδομησιμότητα, με τη χρήση καταλλήλως χαμηλών συγκεντρώσεων (< 100 μg/l) και επικυρωμένης αναλυτικής διαδικασίας. Η ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση μπορεί να υπολογιστεί (βλέπε παράγραφο 54 της μεθόδου δοκιμών), υπό την προϋπόθεση ότι λαμβάνονται υπόψη οι αβιοτικές διεργασίες (προσρόφηση, πτητικότητα κ.λπ.). Ένα παράδειγμα αποτελεί η μελέτη του Nyholm και των συνεργατών του (1)(2), στην οποία χρησιμοποιήθηκε ένας κύκλος 4 ωρών σε σύστημα πλήρωσης και εκκένωσης. Οι συγγραφείς ανέφεραν σταθερές ψευδο-πρώτης τάξης για 5 χημικές ουσίες που προστέθηκαν σε συνθετικά λύματα σε συγκεντρώσεις 5 έως 100 μg/l. (Για την τελική βιοαποικοδομησιμότητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ελεγχόμενες χημικές ουσίες σημασμένες με ^{14}C. Η σχετική περιγραφή δεν εμπίπτει στο πεδίο εφαρμογής της παρούσας μεθόδου δοκιμών, δεδομένου ότι δεν έχουν ακόμη συμφωνηθεί οι διαδικασίες, αν και η προτεινόμενη μέθοδος για το πρότυπο ISO 14592 (3) περιλαμβάνει καθοδήγηση σχετικά με τη χρήση σημασμένων με ^{14}C χημικών ουσιών.

Δοκιμή SCAS

3. Αργότερα προτάθηκε μια απλούστερη δοκιμή δύο σταδίων (4)(5)(6): η μέθοδος ημισυνεχούς ενεργού ιλύος (Semi-Continuous Activated Sludge — SCAS) ακολουθείται από βραχυχρόνιες δοκιμές κινητικής σε δείγματα που λαμβάνονται από τις μονάδες SCAS. Το σύστημα SCAS λειτουργεί με γνωστές παροχές περίσσειας ιλύος (σε αντίθεση με την αρχική μέθοδο δοκιμών Γ.12) και τροφοδοτείται με τροποποιημένα συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ ή οικιακά λύματα. Τα συνθετικά λύματα τροποποιήθηκαν (λόγω μεταβαλλόμενης τιμής pH και ανεπαρκούς καθιζησιμότητας της ιλύος) με την προσθήκη φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, εκχυλίσματος ζυμομυκήτων, χλωριούχου σιδήρου (III) και αλάτων ιχνοστοιχείων και το COD τους αυξήθηκε σε περίπου 750 mg/l, με αύξηση της συγκέντρωσης πεπτόνης και εκχυλίσματος κρέατος. Οι μονάδες λειτουργούσαν σε 24ωρο: αερισμός για 23 ώρες, απόρριψη περίσσειας ιλύος, καθίζηση, αφαίρεση του υπερκειμένου υγρού (εκροή) και, στη συνέχεια, προσθήκη συνθετικών λυμάτων με την ελεγχόμενη χημική ουσία σε συγκέντρωση έως 100 μg/l (δηλαδή στην ίδια περίπου συγκέντρωση με εκείνη που χρησιμοποιήθηκε στη βραχυχρόνια δοκιμή). Μία φορά εβδομαδιαίως το 10 % της συνολικής ιλύος αντικαθίστατο με πρόσφατη ιλύ προκειμένου να διατηρείται ισορροπημένος μικροβιακός πληθυσμός.

4. Μετρώνται οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας αρχικά και στο τέλος του αερισμού και η δοκιμή συνεχίζεται μέχρις ότου επιτευχθεί σταθερή απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Αυτό μπορεί να διαρκέσει από μία εβδομάδα έως αρκετούς μήνες.

Βραχυχρόνια δοκιμή

5. Εφαρμόζεται μια σύντομη δοκιμή (π.χ. 8 ωρών) για τον προσδιορισμό της σταθεράς ταχύτητας κινητικής (ψευδο) πρώτης τάξης που εκφράζει τη διάσπαση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε ενεργό ιλύ γνωστών αλλά διαφορετικών προελεύσεων και ιστορικών. Συγκεκριμένα, λαμβάνονται δείγματα ιλύος από τους αντιδραστήρες SCAS —στο τέλος μιας περιόδου αερισμού, όταν η συγκέντρωση του οργανικού υποστρώματος είναι χαμηλή— κατά τη διάρκεια πειράματος εγκλιματισμού (παράγραφοι 3, 4). Για λόγους σύγκρισης, μπορεί επίσης να ληφθεί ιλύς από μια παράλληλη μονάδα SCAS

▼M4

η οποία δεν εκτίθεται στην ελεγχόμενη χημική ουσία. Τα μείγματα της ιλύος με την ελεγχόμενη χημική ουσία, που προστίθεται σε δύο ή περισσότερες συγκεντρώσεις του εύρους 1-50 μg/l, αερίζονται χωρίς προσθήκη συνθετικών λυμάτων ή άλλου οργανικού υποστρώματος. Η ελεγχόμενη χημική ουσία που παραμένει στο διάλυμα προσδιορίζεται σε τακτά διαστήματα, π.χ. ωριαία, ανάλογα με την αποικοδομησιμότητα της χημικής ουσίας, για μέγιστο χρονικό διάστημα 24 ωρών. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται πριν από την κατάλληλη ανάλυση.

Υπολογισμοί

6. Τα δεδομένα από τις μονάδες SCAS χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της ποσοστιαίας απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (παράγραφος 54). Είναι επίσης δυνατόν να υπολογιστεί μια σταθερά μέσης ταχύτητας, K_1 (κανονικοποιημένη ως προς τη συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών) από τον τύπο:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

όπου

t = χρόνος αερισμού (23 ώρες)

C_e = συγκέντρωση στο τέλος της περιόδου αερισμού (μg/l)

C_i = συγκέντρωση στην αρχή του αερισμού (μg/l)

SS = συγκέντρωση στερεών ενεργού ιλύος (g/l)

7. Στη βραχυχρόνια δοκιμή σχεδιάζεται γραφική παράσταση του λογάριθμου της εκατοστιαίας συγκέντρωσης που απομένει συναρτήσει του χρόνου· η κλίση του αρχικού μέρους του γραφήματος (αποικοδόμηση 10-50 %) είναι ισοδύναμη με την K_1, τη σταθερά (ψευδο)πρώτης τάξης. Η σταθερά κανονικοποιείται ως προς τη συγκέντρωση στερεών της ιλύος με διαίρεση της κλίσης διά της συγκέντρωσης των στερεών ιλύος. Το αναφερόμενο αποτέλεσμα πρέπει επίσης να περιλαμβάνει λεπτομερή στοιχεία για τις αρχικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των αιωρούμενων στερεών, τον χρόνο παραμονής ιλύος, τη φόρτιση και την πηγή της ιλύος, καθώς και για την (τυχόν) προέκθεση στην ελεγχόμενη χημική ουσία.

Μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων

8. Η μεταβλητότητα και άλλες πτυχές της κινητικής της βιοαποικοδόμησης συζητήθηκαν σε πρόσφατη ημερίδα της SETAC (7). Από τέτοιες μελέτες, δημοσιευμένες και υπό δημοσίευση, αναμένεται σύντομα η διαμόρφωση σαφέστερης εικόνας για την κινητική στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, ώστε να καταστεί δυνατή η καλύτερη ερμηνεία των υπαρχόντων δεδομένων και να προταθούν καταλληλότερα σχέδια για μελλοντικές μεθόδους δοκιμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Nyholm N., Jacobsen B.N., Pedersen B.M., Poulsen O., Dambourg A. και Schultz B. (1992), Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability, *Wat. Res.* 26: 339-353.

(2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O. και Ostfeldt P. (1993), Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption, *Wat. Res.* 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998), Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U.T., Pedersen J.P. και Frimer-Larsen H. (1996), Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and μg/l range spiked concentrations, *Chemosphere* 33 (5): 851-864.

(5) Berg U.T. και Nyholm N. (1996), Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (μg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations, *Chemosphere* 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency (1996), Activated sludge biodegradability simulation test, Environmental Project, No. 337, Nyholm N., Berg U.T., Ingerslev F., Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997), Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K. και Verstraete W., 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

Γ.10-Β: Βιομεμβράνες

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι δοκιμές προσομοίωσης εφαρμόζονται κατά κανόνα σε χημικές ουσίες που έχουν αποτύχει σε δοκιμή διαλογής για άμεση βιοαποικοδομησιμότητα [κεφάλαιο Γ.4, μέθοδοι Α έως Ζ του παρόντος παραρτήματος (9)], αλλά έχουν επιτύχει σε δοκιμή εγγενούς βιοαποικοδομησιμότητας. Κατ' εξαίρεση, οι δοκιμές προσομοίωσης εφαρμόζονται επίσης σε οποιαδήποτε χημική ουσία για την οποία απαιτούνται περισσότερες πληροφορίες, ιδίως σε χημικές ουσίες που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες, και κατά κανόνα εφαρμόζεται η δοκιμή ενεργού ιλύος (Γ.10-Α). Σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο, απαιτούνται ειδικές πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά μιας χημικής ουσίας σε μεθόδους επεξεργασίας λυμάτων που περιλαμβάνουν βιομεμβράνες, δηλαδή φίλτρα διήθησης ή χαλικοδιυλιστήρια, περιστρεφόμενους βιολογικούς δίσκους, ρευστοποιημένες κλίνες. Για την κάλυψη αυτής της ανάγκης έχουν αναπτυχθεί διάφορες συσκευές.

2. Οι Gerike et al. (1) χρησιμοποίησαν μεγάλα, πιλοτικής κλίμακας χαλικοδιυλιστήρια σε σύζευξη. Τα φίλτρα αυτά καταλάμβαναν πολύ χώρο και απαιτούσαν σχετικά μεγάλες ποσότητες λυμάτων ή συνθετικών λυμάτων. Οι Truesdale et al. (2) περιέγραψαν μικρότερα φίλτρα (6 πόδια × 6 ίντσες) τα οποία τροφοδοτούνταν με φυσικά λύματα χωρίς επιφανειοδραστικές ουσίες, αλλά εξακολουθούσαν να απαιτούν σχετικά μεγάλους όγκους. Χρειάζονταν 14 εβδομάδες για την ανάπτυξη μιας «ώριμης» βιομεμβράνης και επιπλέον 4-8 εβδομάδες μετά την πρώτη εισαγωγή της επιφανειοδραστικής ελεγχόμενης ουσίας, για τον εγκλιματισμό.

3. Οι Baumann et al. (3) ανέπτυξαν ένα πολύ μικρότερο φίλτρο, στο οποίο χρησιμοποιούνταν πολυεστερικό «πίλημα» που είχε προηγουμένως εμποτιστεί με ενεργό ιλύ, ως αδρανές μέσο υποστήριξης της βιομεμβράνης. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χρησιμοποιούνταν ως η μοναδική πηγή άνθρακα και η εκτίμηση της βιοαποικοδομησιμότητας βασιζόταν σε μετρήσεις του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στις εισροές και τις εκροές, καθώς και στην ποσότητα CO_2 στο αέριο εξόδου.

4. Μια αρκετά διαφορετική προσέγγιση υιοθέτησαν οι Gloyna et al. (4), οι οποίοι εφηύραν τον περιστρεφόμενο σωληνοειδή αντιδραστήρα. Στην εσωτερική επιφάνεια του περιστρεφόμενου σωλήνα αναπτύχθηκε βιομεμβράνη πάνω σε επιφάνεια γνωστού εμβαδού, με τη διαβίβαση εισροής από το άνω άκρο του σωλήνα, ο οποίος διατηρούνταν υπό μικρή κλίση ως προς το οριζόντιο επίπεδο. Ο αντιδραστήρας έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της βιοαποικοδομησιμότητας των επιφανειοδραστικών ουσιών (5), καθώς και για τη διερεύνηση του βέλτιστου πάχους της βιομεμβράνης και της διάχυσης μέσω της μεμβράνης (6). Οι τελευταίοι αυτοί συγγραφείς ανέπτυξαν περαιτέρω τον αντιδραστήρα, μεταξύ άλλων με τροποποίησή του ώστε να παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού του CO_2 στο αέριο εξόδου.

5. Ο περιστρεφόμενος σωληνοειδής αντιδραστήρας έχει εγκριθεί από τη Μόνιμη Επιτροπή Αναλυτών (Ηνωμένο Βασίλειο) ως πρότυπη μέθοδος για την εκτίμηση τόσο της βιοαποικοδομησιμότητας των χημικών ουσιών (7) όσο και της επεξεργασιμότητας και της τοξικότητας των λυμάτων (8). Η μέθοδος που περιγράφεται στο παρόν κεφάλαιο προσφέρει τα πλεονεκτήματα της απλότητας, του μικρού μεγέθους, της αναπαραγωγιμότητας και των σχετικά μικρών αναγκαίων όγκων οργανικού μέσου.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Συνθετικά ή οικιακά λύματα και η ελεγχόμενη χημική ουσία, σε πρόσμιξη ή μεμονωμένα, εφαρμόζονται στην εσωτερική επιφάνεια ενός αργά περιστρεφόμενου κεκλιμένου σωλήνα. Πάνω στην εσωτερική επιφάνεια αναπτύσσεται ένα στρώμα μικροοργανισμών, παρόμοιο με εκείνο που απαντά σε βιόφιλτρα. Οι συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται επαρκής απομάκρυνση της οργανικής ύλης και, εάν απαιτείται, οξείδωση του αμμωνίου.

▼M4

7. Συλλέγεται η εκροή του σωλήνα και αφήνεται να καθιζήσει και/ή διηθείται πριν από την ανάλυση για διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC) και/ή την ελεγχόμενη χημική ουσία με ειδική μέθοδο. Για λόγους σύγκρισης, λειτουργούν παράλληλα υπό τις ίδιες συνθήκες μονάδες-μάρτυρες που δεν δέχονται ελεγχόμενη χημική ουσία. Η διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων DOC στις εκροές των μονάδων δοκιμής και μάρτυρα υποτίθεται ότι οφείλεται στην ελεγχόμενη χημική ουσία και στους οργανικούς μεταβολίτες της. Η διαφορά αυτή συγκρίνεται με τη συγκέντρωση της προστεθείσας ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ως DOC) για τον υπολογισμό της απομάκρυνσης της ουσίας.

8. Κατά κανόνα, η βιοαποικοδόμηση μπορεί να διακριθεί από τη βιοπροσρόφηση με προσεκτική εξέταση της καμπύλης απομάκρυνσης-χρόνου. Η επιβεβαίωση επιτυγχάνεται συνήθως με τη διεξαγωγή δοκιμής άμεσης βιοαποικοδόμηση (πρόσληψη οξυγόνου ή παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα), με εγκλιματισμένο εμβόλιο που λαμβάνεται στο τέλος της δοκιμής από τους αντιδραστήρες οι οποίοι δέχονται την ελεγχόμενη χημική ουσία.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

9. Για να είναι δυνατή η ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων, πρέπει να είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά καθαρότητας, υδατοδιαλυτότητας, πτητικότητας και προσρόφησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

10. Κατά κανόνα, οι πτητικές και οι δυσδιάλυτες χημικές ουσίες μπορούν να ελεγχθούν μόνο εφόσον λαμβάνονται ειδικές προφυλάξεις (βλέπε προσάρτημα 5 του κεφαλαίου Γ.10-Α). Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστή η χημική δομή, ή τουλάχιστον ο εμπειρικός τύπος, ώστε να υπολογίζονται οι θεωρητικές τιμές και/ή να ελέγχονται οι μετρούμενες τιμές των παραμέτρων, π.χ. θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD), διαλυμένος οργανικός άνθρακας (DOC).

11. Οι πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για μικροοργανισμούς (βλέπε προσάρτημα 4 του κεφαλαίου Γ.10-Α) μπορεί να είναι χρήσιμες για την επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων για τη δοκιμή και ουσιαστικής σημασίας για την ορθή ερμηνεία των χαμηλών τιμών βιοαποικοδόμησης.

ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ

12. Αρχικά, η πρωτοβάθμια βιοαποικοδόμηση των επιφανειοδραστικών ουσιών έπρεπε να φθάνει ή και να υπερβαίνει το 80 %, προκειμένου να επιτραπεί η διάθεσή τους στο εμπόριο. Εάν δεν επιτυγχάνεται η τιμή του 80 %, μπορεί να εφαρμοστεί η παρούσα (επιβεβαιωτική) δοκιμή προσομοίωσης και η επιφανειοδραστική ουσία μπορεί να διατεθεί στο εμπόριο μόνον εάν απομακρύνεται περισσότερο από το 90 % της συγκεκριμένης χημικής ουσίας. Με τις χημικές ουσίες, γενικά, δεν τίθεται ζήτημα επιπέδων επιτυχίας/αποτυχίας και η τιμή ποσοστιαίας απομάκρυνσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προσεγγιστικούς υπολογισμούς της πιθανής συγκέντρωσης στο περιβάλλον, η οποία πρέπει να χρησιμοποιείται στις εκτιμήσεις των κινδύνων από χημικές ουσίες. Σε μια σειρά μελετών με καθαρές χημικές ουσίες, η ποσοστιαία απομάκρυνση DOC διαπιστώθηκε ότι είναι > 90 % για περισσότερο από τα τρία τέταρτα και > 80 % για πάνω από το 90 % των χημικών ουσιών που παρουσίασαν σημαντικό βαθμό βιοαποικοδομησιμότητας.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

13. Για να διασφαλίζεται η ορθή διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, είναι χρήσιμη η κατά καιρούς δοκιμασία χημικών ουσιών αναφοράς, των οποίων η συμπεριφορά είναι γνωστή. Στις χημικές ουσίες αναφοράς συγκαταλέγονται το αδιπικό οξύ, η 2-φαινυλο φαινόλη, η 1-ναφθόλη, το διφαινικό οξύ και το 1-ναφθοϊκό οξύ.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

14. Σε εργαστήριο του Ηνωμένου Βασιλείου διαπιστώθηκε ότι η σχετική τυπική απόκλιση εντός των δοκιμών ανέρχεται σε 3,5 % και μεταξύ των δοκιμών σε 5 % (7).

▼M4

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εξοπλισμός

Περιστρεφόμενοι σωληνοειδείς αντιδραστήρες

15. Η συσκευή (βλέπε προσάρτημα 8, σχήματα 1 και 2) αποτελείται από μια τράπεζα με ακρυλικούς σωλήνες μήκους 30,5 cm και εσωτερικής διαμέτρου 5 cm ο καθένας, που στηρίζονται σε τροχούς με ελαστικά επίσωτρα, τοποθετημένους μέσα σε μεταλλικό πλαίσιο υποστήριξης. Κάθε σωλήνας διαθέτει εξωτερικό χείλος, βάθους περίπου 0,5 cm, ώστε να συγκρατείται πάνω στους τροχούς, ενώ η εσωτερική του επιφάνεια τραχύνεται με χοντρό ατσαλόσυρμα και στο άνω άκρο (τροφοδοσίας) υπάρχει ένα εσωτερικό χείλος βάθους 0,5 cm προκειμένου να συγκρατείται το υγρό. Οι σωλήνες έχουν κλίση περίπου μιας μοίρας ως προς το οριζόντιο επίπεδο για να επιτυγχάνεται ο απαιτούμενος χρόνος επαφής όταν το μέσο δοκιμής εισάγεται σε καθαρό σωλήνα. Οι τροχοί με τα ελαστικά επίσωτρα περιστρέφονται από κινητήρα μικρής, μεταβλητής ταχύτητας. Η θερμοκρασία των σωλήνων ελέγχεται μέσω της εγκατάστασής τους σε αίθουσα σταθερής θερμοκρασίας.

16. Με την τοποθέτηση κάθε σωληνοειδούς αντιδραστήρα μέσα σε έναν ελαφρώς μεγαλύτερο, πωματισμένο σωλήνα και τη διασφάλιση της αεροστεγανότητας των συνδέσεων, καθίσταται δυνατή η συλλογή του αερίου εξόδου CO_2 σε αλκαλικό διάλυμα για επακόλουθη μέτρηση (6).

17. Σε ένα αποθηκευτικό δοχείο χωρητικότητας 20 L, περιέχεται, για κάθε σωλήνα, προμήθεια 24ώρου του οργανικού μέσου, στο οποίο έχει προστεθεί η ελεγχόμενη χημική ουσία, κατά περίπτωση (A) (βλέπε σχήμα 2). Εάν απαιτείται, το διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μπορεί να εισάγεται χωριστά. Κοντά στον πυθμένα κάθε δοχείου αποθήκευσης υπάρχει ένα στόμιο το οποίο συνδέεται με κατάλληλη σωλήνωση, π.χ. από ελαστικό σιλικόνης, μέσω περισταλτικής αντλίας (B), με έναν γυάλινο ή ακρυλικό σωλήνα διανομής που εισχωρεί κατά 2 έως 4 cm στο ανώτερο άκρο (τροφοδοσίας) του κεκλιμένου σωλήνα (C). Η εκροή αφήνεται να σταλάξει από το κατώτερο άκρο του κεκλιμένου σωλήνα, για να συλλεχθεί σε άλλο δοχείο αποθήκευσης (D). Η εκροή υποβάλλεται σε καθίζηση ή διήθηση πριν από την ανάλυση.

Συσκευή διήθησης ή φυγόκεντρος

18. Συσκευή για τη διήθηση δειγμάτων με διηθητικές μεμβράνες κατάλληλου πορώδους (ονομαστική διάμετρος οπών 0,45μm), οι οποίες προσροφούν οργανικές χημικές ουσίες ή ελευθερώνουν οργανικό άνθρακα σε ελάχιστο βαθμό. Εάν χρησιμοποιούνται ηθμοί που ελευθερώνουν οργανικό άνθρακα, εκπλύνονται επιμελώς με θερμό νερό για την απομάκρυνση του στραγγίσιμου οργανικού άνθρακα. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί φυγόκεντρος ικανή να λειτουργεί σε 40 000 m/s^2.

19. Αναλυτικός εξοπλισμός για να προσδιοριστούν τα εξής:

— DOC/ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) ή χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD),

— συγκεκριμένες χημικές ουσίες (HPLC, αεριοχρωματογραφία κ.λπ.), εάν απαιτείται,

— pH, θερμοκρασία, οξύτητα και αλκαλικότητα,

— αμμώνιο και νιτρώδη και νιτρικά ιόντα, εάν η δοκιμή εκτελείται υπό συνθήκες νιτροποίησης.

Νερό

20. Νερό βρύσης, που περιέχει λιγότερο από 3 mg/l DOC.

21. Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό που περιέχει λιγότερο από 2 mg/l DOC.

▼M4

Οργανικό μέσο

22. Ως οργανικό μέσο μπορούν να χρησιμοποιούνται συνθετικά λύματα, οικιακά λύματα ή μείγμα των δύο. Έχει αποδειχθεί ότι η χρήση μόνο οικιακών λυμάτων εξασφαλίζει συχνά αυξημένη ποσοστιαία απομάκρυνση DOC (σε μονάδες ενεργού ιλύος) και επιτρέπει ακόμη και τη βιοαποικοδόμηση ορισμένων χημικών ουσιών που δεν βιοαποικοδομούνται όταν χρησιμοποιούνται συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ. Συνιστάται, επομένως, η χρήση οικιακών λυμάτων. Μετράται η συγκέντρωση DOC ή COD σε κάθε νέα παρτίδα οργανικού μέσου. Η οξύτητα ή αλκαλικότητα του οργανικού μέσου θα πρέπει να είναι γνωστή. Εάν το μέσο είναι χαμηλής οξύτητας ή αλκαλικότητας, ενδέχεται να απαιτηθεί η προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (όξινου ανθρακικού νατρίου ή όξινου φωσφορικού καλίου) για τη διατήρηση του pH στην τιμή 7,5 ± 0,5 στο δοχείο αερισμού κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Η ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος που θα προστεθεί και ο χρόνος προσθήκης του πρέπει να αποφασίζονται κατά περίπτωση.

Συνθετικά λύματα

23. Διαλύονται σε 1 λίτρο νερού βρύσης: πεπτόνη, 160 mg· εκχύλισμα κρέατος, 110 mg· ουρία, 30 mg· άνυδρο όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4), 28 mg· χλωριούχο νάτριο (NaCl), 7 mg· διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg· επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4.7H_2O$), 2 mg. Τα συγκεκριμένα συνθετικά λύματα του ΟΟΣΑ αποτελούν παράδειγμα και παρέχουν μέση συγκέντρωση DOC στην εισροή της τάξης των 100 mg/l. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται άλλες συνθέσεις, με περίπου τις ίδιες συγκεντρώσεις DOC, οι οποίες προσεγγίζουν περισσότερο τα πραγματικά λύματα. Αυτά τα συνθετικά λύματα μπορούν να παρασκευάζονται με αποσταγμένο νερό σε συμπυκνωμένη μορφή και να φυλάσσονται σε θερμοκρασία περίπου 1 °C για μέγιστο διάστημα μία εβδομάδας. Όταν χρειάζεται, αραιώνονται με νερό βρύσης. (Το μέσο αυτό δεν είναι ικανοποιητικό, π.χ. η συγκέντρωση αζώτου είναι πολύ υψηλή, η περιεκτικότητα σε άνθρακα σχετικά χαμηλή, αλλά δεν έχει προταθεί καλύτερη εναλλακτική λύση, εκτός από την προσθήκη περισσότερου φωσφορικού άλατος ως ρυθμιστικού διαλύματος και επιπλέον πεπτόνης).

Οικιακά λύματα

24. Χρησιμοποιούνται πρόσφατα καθιζημένα λύματα που συλλέγονται καθημερινά από εγκαταστάσεις επεξεργασίας οι οποίες δέχονται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα. Θα πρέπει να συλλέγονται από την τάφρο υπερχείλισης της δεξαμενής πρωτοβάθμιας καθίζησης ή από την τροφοδοσία της εγκατάστασης ενεργού ιλύος και να είναι σε μεγάλο βαθμό απαλλαγμένα από χονδρόκοκκα σωματίδια. Τα λύματα μπορούν να χρησιμοποιούνται μετά την αποθήκευση για αρκετές ημέρες στους 4 °C περίπου, εάν έχει αποδειχθεί ότι ο DOC (ή το COD) δεν μειώνεται σημαντικά (δηλαδή κατά λιγότερο από 20 %) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Προκειμένου να περιορίζονται οι διαταραχές στο σύστημα, ο DOC (ή το COD) κάθε νέας παρτίδας θα πρέπει να ρυθμίζεται, πριν από τη χρήση, σε κατάλληλη σταθερή τιμή, π.χ. μέσω αραίωσης με νερό βρύσης.

Λιπαντικό

25. Για τη λίπανση των κυλίνδρων της περισταλτικής αντλίας μπορεί να χρησιμοποιείται γλυκερόλη ή ελαιόλαδο: και τα δύο είναι κατάλληλα για χρήση σε σωληνώσεις από ελαστικό σιλικόνης.

Διαλύματα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

26. Για χημικές ενώσεις επαρκούς διαλυτότητας, παρασκευάζονται διαλύματα παρακαταθήκης με κατάλληλες συγκεντρώσεις (π.χ. 1 έως 5 g/l) σε απιονισμένο νερό ή στο ανόργανο τμήμα των συνθετικών λυμάτων. Για αδιάλυτες χημικές ουσίες, βλέπε προσάρτημα 5 του κεφαλαίου Γ.10-Α. Η μέθοδος αυτή δεν είναι κατάλληλη για τις πτητικές χημικές ουσίες, χωρίς τροποποιήσεις στους σωληνοειδείς αντιδραστήρες (παράγραφος 16). Προσδιορίζονται ο DOC και ο TOC του διαλύματος παρακαταθήκης και επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις για κάθε νέα παρτίδα. Εάν η διαφορά μεταξύ του DOC και του TOC είναι μεγαλύτερη από 20 %, ελέγχεται η υδατοδιαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Συγκρίνεται ο DOC ή η συγκέντρωση της

▼M4

ελεγχόμενης χημικής ουσίας, που έχει μετρηθεί με ειδική ανάλυση του διαλύματος παρακαταθήκης, με την ονομαστική τιμή, προκειμένου να εξακριβωθεί κατά πόσον η ανάκτηση είναι αρκετά ικανοποιητική (κανονικά αναμένεται > 90 %). Εξακριβώνεται, ειδικά για τις διασπορές, κατά πόσον ο DOC μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναλυτική παράμετρος ή αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μια ειδική για την ελεγχόμενη χημική ουσία αναλυτική τεχνική. Για τις διασπορές απαιτείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων. Για κάθε νέα παρτίδα, μετράται ο DOC, το COD ή η ελεγχόμενη χημική ουσία με ειδική ανάλυση.

27. Προσδιορίζεται το pH του διαλύματος παρακαταθήκης. Τυχόν ακραίες τιμές υποδηλώνουν ότι η προσθήκη της χημικής ουσίας μπορεί να επιδρά στο pH της ενεργού ιλύος στο σύστημα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, εξουδετερώνεται το διάλυμα παρακαταθήκης, ώστε να επιτευχθεί pH 7 ± 0,5, με μικρές ποσότητες ανόργανου οξέος ή ανόργανης βάσης, αλλά πρέπει να αποφεύγεται η καθίζηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρασκευή του οργανικού μέσου για τροφοδοσία

28. Εξακριβώνεται ότι όλα τα δοχεία των εισροών και των εκροών και οι σωληνώσεις από δοχεία εισροών προς δοχεία εκροών έχουν καθαριστεί επιμελώς προκειμένου να αφαιρεθεί η μικροβιακή χλωρίδα, τόσο στην αρχή όσο και σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

29. Παρασκευάζονται καθημερινά νέα συνθετικά λύματα (παράγραφος 23), είτε από τα στερεά είτε από το πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης, με κατάλληλη αραίωση με νερό βρύσης. Μετράται η απαιτούμενη ποσότητα σε κύλινδρο και προστίθεται σε καθαρό δοχείο εισροής. Επίσης, όπου είναι απαραίτητο, προστίθεται στα συνθετικά λύματα, πριν από την αραίωση, η απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή της χημικής ουσίας αναφοράς. Εφόσον εξυπηρετεί περισσότερο ή είναι απαραίτητο για να αποφευχθεί η απώλεια ελεγχόμενης χημικής ουσίας, παρασκευάζεται χωριστό αραιωμένο διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε χωριστό δοχείο και διανέμεται στους κεκλιμένους σωλήνες με διαφορετική δοσομετρική αντλία.

30. Εναλλακτικά (και κατά προτίμηση), χρησιμοποιούνται καθιζημένα οικιακά λύματα (παράγραφος 24) τα οποία είναι πρόσφατα και συλλέγονται καθημερινά, εάν είναι δυνατόν.

Λειτουργία των περιστρεφόμενων σωληνοειδών αντιδραστήρων

31. Για την αξιολόγηση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, απαιτούνται δύο πανομοιότυποι σωληνοειδείς αντιδραστήρες οι οποίοι συναρμολογούνται σε αίθουσα σταθερής θερμοκρασίας, κατά κανόνα 22 ± 2 °C.

32. Ρυθμίζονται οι περισταλτικές αντλίες κατά τρόπο ώστε να διανέμουν 250 ± 25 ml/ώρα του οργανικού μέσου (χωρίς ελεγχόμενη χημική ουσία) στους κεκλιμένους σωλήνες, οι οποίοι περιστρέφονται μεν ταχύτητα 18 ± 2 rpm (σ.α.λ.). Στην αρχή της δοκιμής και περιοδικά κατά τη διάρκειά της, απλώνεται το λιπαντικό (παράγραφος 25) στους σωλήνες της αντλίας για να εξασφαλιστεί η εύρυθμη λειτουργία και να παραταθεί η διάρκεια ζωής των σωληνώσεων.

33. Ρυθμίζεται η γωνία κλίσης των σωλήνων ως προς το οριζόντιο επίπεδο για να επιτευχθεί χρόνος παραμονής του υλικού τροφοδοσίας σε καθαρό σωλήνα 125 ± 12,5 δευτερόλεπτα. Υπολογίζεται ο χρόνος παραμονής με την προσθήκη μη βιολογικού δείκτη (π.χ. NaCl, αδρανής χρωστική) στο υλικό τροφοδοσίας: ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη μέγιστης συγκέντρωσης στην εκροή θεωρείται ως ο μέσος χρόνος παραμονής (όταν υπάρχει η μέγιστη μεμβράνη, ο χρόνος παραμονής μπορεί να αυξηθεί μέχρι τα 30 λεπτά περίπου).

34. Έχει διαπιστωθεί ότι ανωτέρω παροχές, ταχύτητες και χρόνοι παρέχουν επαρκείς απομακρύνσεις (> 80 %) του DOC (ή COD) και νιτροποιημένες εκροές. Η ταχύτητα ροής θα πρέπει να αλλάζει, εάν η απομάκρυνση είναι ανεπαρκής ή εάν πρόκειται να προσομοιωθούν οι επιδόσεις συγκεκριμένης εγκατάστασης επεξεργασίας. Στη δεύτερη περίπτωση, ρυθμίζεται η δοσομέτρηση του οργανικού μέσου έως ότου οι επιδόσεις του αντιδραστήρα αντιστοιχούν σε εκείνες της εγκατάστασης επεξεργασίας.

▼M4

Εμβολιασμός

35. Ο αερόφερτος εμβολιασμός μπορεί να είναι επαρκής για να αρχίσει η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όταν χρησιμοποιούνται συνθετικά λύματα. Σε αντίθετη περίπτωση, προστίθεται 1 ml/l καθιζημένων λυμάτων στην τροφοδοσία για 3 ημέρες.

Μετρήσεις

36. Ανά τακτά διαστήματα εξακριβώνεται ότι η δοσομέτρηση και οι ταχύτητες περιστροφής περικλείονται εντός των απαιτούμενων ορίων. Επίσης, μετράται το pH της εκροής, ιδίως εάν αναμένεται νιτροποίηση.

Δειγματοληψία και ανάλυση

37. Η μέθοδος, ο τύπος και η συχνότητα της δειγματοληψίας επιλέγονται έτσι ώστε να εξυπηρετούν τον σκοπό της δοκιμής. Για παράδειγμα, λαμβάνονται στιγμιαία δείγματα εισροής και εκροής ή συλλέγονται δείγματα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, π.χ. 3-6 ώρες. Κατά την πρώτη περίοδο, χωρίς την παρουσία ελεγχόμενης χημικής ουσίας, λαμβάνονται δείγματα δύο φορές την εβδομάδα. Τα δείγματα διηθούνται μέσω μεμβρανών ή φυγοκεντρούνται σε περίπου 40 000 m/sec^2 για περίπου 15 λεπτά (παράγραφος 18). Ενδέχεται να είναι απαραίτητη η καθίζηση και/ή η διήθηση με χοντρό ηθμό των δειγμάτων, πριν από τη διήθηση με μεμβράνη. Προσδιορίζεται ο DOC (ή το COD) τουλάχιστον εις διπλούν και, εφόσον απαιτείται, το BOD, το αμμώνιο και τα νιτρώδη/νιτρικά ιόντα.

38. Όλες οι αναλύσεις θα πρέπει να εκτελούνται το συντομότερο δυνατόν μετά τη συλλογή και την προετοιμασία των δειγμάτων. Εάν πρέπει να αναβληθούν οι αναλύσεις, τα δείγματα φυλάσσονται στους 4 °C περίπου, στο σκοτάδι, μέσα σε πλήρεις, ερμητικά σφραγισμένες φιάλες. Εάν χρειάζεται να φυλαχθούν τα δείγματα για περισσότερο από 48 ώρες, διατηρούνται με κατάψυξη, οξίνιση ή με την προσθήκη κατάλληλης τοξικής χημικής ουσίας [π.χ. 20 ml/l διαλύματος χλωριούχου υδραργύρου (II) 10 g/l]. Εξακριβώνεται ότι η τεχνική διατήρησης δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Περίοδος κανονικής λειτουργίας

39. Κατά την περίοδο αυτή, αναπτύσσεται η επιφανειακή βιομεμβράνη για να αποκτήσει βέλτιστο πάχος, διαδικασία για την οποία συνήθως χρειάζονται περίπου 2 εβδομάδες, ενώ δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 6 εβδομάδες. Η απομάκρυνση (παράγραφος 44) του DOC (ή COD) αυξάνεται και φθάνει σε μια τιμή οριζοντίωσης (σταθερή κατάσταση). Όταν επιτευχθεί οριζοντίωση σε παρόμοια τιμή και στους δύο σωλήνες, επιλέγεται ο ένας ως μάρτυρας για το υπόλοιπο διάστημα της δοκιμής, κατά το οποίο οι επιδόσεις τους θα πρέπει να συμφωνούν μεταξύ τους.

Εισαγωγή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

40. Σε αυτό το στάδιο προστίθεται η ελεγχόμενη χημική ουσία στον άλλο αντιδραστήρα στην απαιτούμενη συγκέντρωση, συνήθως 10-20 mg C/l. Ο σωλήνας-μάρτυρας εξακολουθεί να δέχεται μόνο το οργανικό μέσο.

Περίοδος εγκλιματισμού

41. Συνεχίζονται οι αναλύσεις για DOC (ή COD) δύο φορές την εβδομάδα και, σε περίπτωση που πρέπει να εκτιμηθεί η πρωτοβάθμια βιοαποικοδομησιμότητα, μετράται επίσης η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με ειδική ανάλυση. Αφήνεται περιθώριο μιας έως έξι εβδομάδων (ή και περισσότερο, υπό ειδικές συνθήκες) μετά την εισαγωγή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, για εγκλιματισμό. Όταν η ποσοστιαία απομάκρυνση (παράγραφοι 43-45) φθάσει στη μέγιστη τιμή, λαμβάνονται 12-15 έγκυρες τιμές στη φάση οριζοντίωσης επί 3 εβδομάδες περίπου για την αξιολόγηση της μέσης ποσοστιαίας απομάκρυνσης. Η δοκιμή θεωρείται ότι ολοκληρώνεται εάν έχει επιτευχθεί επαρκώς υψηλός βαθμός απομάκρυνσης. Κατά κανόνα, η διάρκεια της δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 12 εβδομάδες από την πρώτη προσθήκη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

▼M4

Απόσπαση της μεμβράνης

42. Η αιφνίδια απόσπαση μεγάλων ποσοτήτων περίσσειας μεμβράνης από τους σωλήνες (sloughing) εμφανίζεται σε σχετικά τακτά χρονικά διαστήματα. Για να εξασφαλίζεται ότι η συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων παραμένει ανεπηρέαστη, οι δοκιμές πρέπει να καλύπτουν τουλάχιστον δύο πλήρεις κύκλους ανάπτυξης και απόσπασης.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

43. Υπολογίζεται το ποσοστό απομάκρυνσης DOC (ή COD) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για κάθε χρόνο εκτίμησης, με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

όπου

D_t = ποσοστό απομάκρυνσης DOC (ή COD) σε χρόνο t,

Cs = συγκέντρωση DOC ή COD στην εισροή λόγω της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, υπολογιζόμενη, κατά προτίμηση, από τη συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης και τον προστιθέμενο όγκο του (mg/l),

E = μετρούμενη τιμή DOC ή COD στην εκροή της μονάδας δοκιμής σε χρόνο t (mg/l),

Eo = μετρούμενη τιμή DOC ή COD στην εκροή της μονάδας-μάρτυρα σε χρόνο t (mg/l).

Επαναλαμβάνεται ο υπολογισμός για τη χημική ουσία αναφοράς, εάν έχει χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή.

Επιδόσεις του αντιδραστήρα-μάρτυρα

44. Ο βαθμός απομάκρυνσης του DOC (ή COD) του οργανικού μέσου (D_B) στους αντιδραστήρες-μάρτυρες αποτελεί χρήσιμο στοιχείο για την εκτίμηση της βιοαποικοδομητικής δραστικότητας της βιομεμβράνης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Υπολογίζεται η ποσοστιαία απομάκρυνση από την εξίσωση:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

όπου

Cm = DOC (ή COD) του οργανικού μέσου στην εισροή της μονάδας-μάρτυρα (mg/l).

45. Υπολογίζεται η απομάκρυνση (D_{ST}) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν μετράται με ειδική μέθοδο ανάλυσης, για κάθε χρόνο εκτίμησης, από την εξίσωση:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\ \%$$

όπου

Si = μετρούμενη ή, κατά προτίμηση, εκτιμώμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εισροή της μονάδας δοκιμής (mg/l)

Se = μετρούμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην εκροή της μονάδας δοκιμής σε χρόνο t (mg/l)

▼M4

Εάν η αναλυτική μέθοδος παρέχει θετική τιμή για μη τροποποιημένα λύματα ισοδύναμη με S_c mg/l, υπολογίζεται η ποσοστιαία απομάκρυνση (D_{SC}) από τον τύπο:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

Έκφραση των αποτελεσμάτων της δοκιμής

46. Σχεδιάζεται γραφική παράσταση του ποσοστού απομάκρυνσης D_t και D_{ST} (ή D_{SC}), εάν διατίθεται, συναρτήσει του χρόνου (βλέπε προσάρτημα 2 του κεφαλαίου Γ.10-Α). Ως ποσοστιαία απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θεωρείται ο αριθμητικός μέσος (στρογγυλοποιημένος στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό) με την τυπική απόκλιση των 12-15 τιμών που έχουν ληφθεί για την D_T (και την D_{ST}, αν διατίθεται) στη φάση οριζοντίωσης. Από το σχήμα της καμπύλης απομάκρυνσης είναι δυνατόν να συναχθούν ορισμένα συμπεράσματα σχετικά με τις διεργασίες απομάκρυνσης.

Προσρόφηση

47. Εάν παρατηρείται υψηλός βαθμός απομάκρυνσης DOC της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην αρχή της δοκιμής, η ελεγχόμενη χημική ουσία απομακρύνεται ενδεχομένως μέσω προσρόφησης στη βιομεμβράνη. Η απόδειξη αυτού είναι δυνατή με τον προσδιορισμό της προσροφημένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας στα στερεά που αποσπώνται από τη μεμβράνη. Δεν είθισται να παραμένει υψηλός ο βαθμός απομάκρυνσης DOC των προσροφήσιμων χημικών ουσιών καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Κατά κανόνα, ο βαθμός απομάκρυνσης είναι αρχικά υψηλός και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά, για να φθάσει σε μια τιμή ισορροπίας. Εάν, ωστόσο, η προσροφημένη ελεγχόμενη χημική ουσία ήταν ικανή να προκαλέσει εγκλιματισμό του μικροβιακού πληθυσμού, η απομάκρυνση DOC της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα αυξανόταν στη συνέχεια, φθάνοντας σε υψηλή τιμή οριζοντίωσης.

Λανθάνουσα φάση

48. Όπως και στις στατικές δοκιμές διαλογής, για πολλές ελεγχόμενες χημικές ουσίες απαιτείται μια λανθάνουσα φάση πριν από την πλήρη βιοαποικοδόμηση. Κατά τη λανθάνουσα φάση, λαμβάνει συντελείται ο εγκλιματισμός (ή η προσαρμογή) των βακτηριδίων αποικοδόμησης, με σχεδόν μηδενική απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στη συνέχεια, σημειώνεται η αρχική ανάπτυξη των βακτηριδίων αυτών. Η συγκεκριμένη φάση ολοκληρώνεται και η φάση της αποικοδόμησης θεωρείται αυθαίρετα ότι αρχίζει, όταν έχει απομακρυνθεί περίπου το 10 % της αρχικής ποσότητας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (λαμβανομένης υπόψη της προσρόφησης, εάν υπάρξει). Η λανθάνουσα φάση παρουσιάζει συχνά μεγάλη μεταβλητότητα και μικρή αναπαραγωγιμότητα.

Φάση οριζοντίωσης

49. Η φάση οριζοντίωσης της καμπύλης απομάκρυνσης σε μια συνεχόμενη δοκιμή ορίζεται ως η φάση κατά την οποία σημειώνεται η μέγιστη αποικοδόμηση. Η φάση αυτή θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 3 εβδομάδες και να εμφανίζει 12-15 έγκυρες μετρηθείσες τιμές.

Μέσος βαθμός απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

50. Υπολογίζεται η μέση τιμή από τις τιμές απομάκρυνσης (D_t) (και D_{st}, εάν είναι διαθέσιμη) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη φάση οριζοντίωσης. Η τιμή αυτή, αφού στρογγυλοποιηθεί στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό (1 %), είναι ο βαθμός απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Συνιστάται, επίσης, ο υπολογισμός του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % της μέσης τιμής. Με παρόμοιο τρόπο υπολογίζεται ο μέσος βαθμός απομάκρυνσης (D_B) του οργανικού μέσου στο δοχείο-μάρτυρα.

▼M4

Ένδειξη βιοαποικοδόμησης

51. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν προσροφάται σημαντικά στη βιομεμβράνη και η καμπύλη απομάκρυνσης έχει το τυπικό σχήμα μιας καμπύλης βιοαποικοδόμησης, με λανθάνουσα φάση, φάση αποικοδόμησης και φάση οριζοντίωσης (παράγραφοι 48, 49), η μετρούμενη απομάκρυνση μπορεί με ασφάλεια να αποδοθεί στη βιοαποικοδόμηση. Εάν έχει σημειωθεί υψηλός αρχικός βαθμός απομάκρυνσης, η δοκιμή προσομοίωσης δεν μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ βιολογικών και αβιοτικών διεργασιών απομάκρυνσης. Σε τέτοιες περιπτώσεις, καθώς και σε άλλες όπου υπάρχει αμφιβολία σχετικά με τη βιοαποικοδόμηση (π.χ. εάν συντελείται αφαίρεση), εκτελείται ανάλυση της προσροφημένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε δείγματα της μεμβράνης ή διεξάγονται πρόσθετες στατικές δοκιμές (διαλογής) για βιοαποικοδομησιμότητα, με βάση παραμέτρους που αποτελούν σαφείς ενδείξεις βιολογικών διεργασιών. Τέτοιες δοκιμές είναι οι μέθοδοι πρόσληψης οξυγόνου (κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος, μέθοδοι Δ, Ε και Ζ) (9) ή μια δοκιμή μέτρησης της παραγωγής CO_2 (κεφάλαιο Γ.4, μέθοδος Γ του παρόντος παραρτήματος, ή η μέθοδος υπερκείμενης φάσης) (10). Ως εμβόλιο χρησιμοποιείται προεκτεθειμένη βιομεμβράνη από τον κατάλληλο αντιδραστήρα.

52. Εάν έχουν μετρηθεί τόσο η απομάκρυνση DOC, όσο και η απομάκρυνση συγκεκριμένων χημικών ουσιών, σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποσοστών που απομακρύνονται (το πρώτο να είναι χαμηλότερο από τη δεύτερο) υποδηλώνουν την παρουσία ενδιάμεσων οργανικών προϊόντων στις εκροές, τα οποία μπορεί να είναι πιο δύσκολο να αποικοδομηθούν. Τα προϊόντα αυτά θα πρέπει να διερευνώνται.

Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμής

53. Η δοκιμή θεωρείται έγκυρη, εάν ο βαθμός απομάκρυνσης DOC (ή COD) (D_B) στις μονάδες-μάρτυρες είναι > 80 % μετά από λειτουργία 2 εβδομάδων και δεν έχουν καταγραφεί ασυνήθιστες παρατηρήσεις.

54. Εάν υποβλήθηκε σε δοκιμή μια ευκόλως βιοαποικοδομήσιμη χημική ουσία (αναφοράς), ο βαθμός βιοαποικοδόμησης θα πρέπει να είναι > 90 % και η διαφορά μεταξύ των εις διπλούν τιμών δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5 %. Εάν δεν πληρούνται τα δύο αυτά κριτήρια, επανεξετάζονται οι πειραματικές διαδικασίες και/ή χρησιμοποιούνται οικιακά λύματα από άλλη πηγή.

55. Ομοίως, οι διαφορές μεταξύ των τιμών βιοαποικοδόμησης από διπλές μονάδες (εάν χρησιμοποιούνται) που επεξεργάζονται μια ελεγχόμενη χημική ουσία δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 5 %. Εάν το κριτήριο αυτό δεν πληρούται, αλλά οι βαθμοί απομάκρυνσης είναι υψηλοί, συνεχίζεται η ανάλυση για τρεις ακόμη εβδομάδες. Εάν η απομάκρυνση είναι χαμηλή, διερευνώνται οι ανασταλτικές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εφόσον δεν είναι γνωστές, και επαναλαμβάνεται η δοκιμή με χαμηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν αυτό είναι εφικτό.

Έκθεση δοκιμής

56. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— δεδομένα ταυτοποίησης,

— φυσική μορφή και, όπου απαιτείται, φυσικοχημικές ιδιότητες.

Συνθήκες δοκιμής:

— τυχόν τροποποιήσεις του συστήματος δοκιμής, ειδικά εάν έχουν υποβληθεί σε δοκιμή αδιάλυτες ή πτητικές ουσίες,

— τύπος οργανικού μέσου,

— αναλογία και είδος των βιομηχανικών αποβλήτων στα λύματα, εφόσον χρησιμοποιήθηκαν και τα στοιχεία αυτά είναι γνωστά,

— μέθοδος εμβολιασμού,

▼M4

— διάλυμα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας — περιεκτικότητα σε DOC (διαλυμένος οργανικός άνθρακας) και TOC (ολικός οργανικός άνθρακας), τρόπος παρασκευής, εναιώρημα ή όχι, συγκεντρώσεις δοκιμής, λόγοι για τους οποίους ο DOC δεν κυμαινόταν μεταξύ 10 και 20 mg/l, μέθοδος προσθήκης, ημερομηνία πρώτης προσθήκης, τυχόν μεταβολές της συγκέντρωσης,

— μέσος υδραυλικός χρόνος παραμονής (χωρίς ανάπτυξη), ταχύτητα περιστροφής του σωλήνα, κατά προσέγγιση γωνία κλίσης, εάν είναι δυνατόν,

— λεπτομέρειες σχετικά με την απόσπαση μεμβράνης, χρόνος και ένταση,

— θερμοκρασία δοκιμής και εύρος,

— αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν.

Αποτελέσματα της δοκιμής:

— όλα τα μετρηθέντα δεδομένα DOC, COD, ειδικές αναλύσεις, pH, θερμοκρασία, αζωτούχες χημικές ουσίες, εάν έχουν σημασία,

— όλα τα μετρηθέντα δεδομένα D_t (ή D_{tc}), D_B, D_S σε μορφή πίνακα και οι καμπύλες απομάκρυνσης,

— πληροφορίες σχετικά με τη λανθάνουσα φάση και τη φάση οριζοντίωσης, τη διάρκεια δοκιμής, τον βαθμό απομάκρυνσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, της χημικής ουσίας αναφοράς (εάν χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή) και του οργανικού μέσου (στη μονάδα-μάρτυρα), συνοδευόμενες από στατιστικά στοιχεία και δηλώσεις για τη βιοαποικοδομησιμότητα και την εγκυρότητα της δοκιμής,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980), Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test, *Wat. Res.* 14: 753-758.

(2) Truesdale G.A., Jones K., Vandyke K.G. (1959), Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material, *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441-444.

(3) Baumann U., Kuhn G. και Benz M. (1998), Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 10: 214-220.

(4) Gloyna E.F., Comstock R.F., Renn C.E. (1952), Rotary tubes as experimental trickling filters, *Sewage ind. Waste* 24: 1355-1357.

(5) Kumke G.W., Renn C.E. (1966), LAS removal across an institutional trickling filter, *J.A.O.C.S.* 43: 92-94.

(6) Tomlinson T.G., Snaddon D.H.M. (1966), Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms, *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982), Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984), Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας.

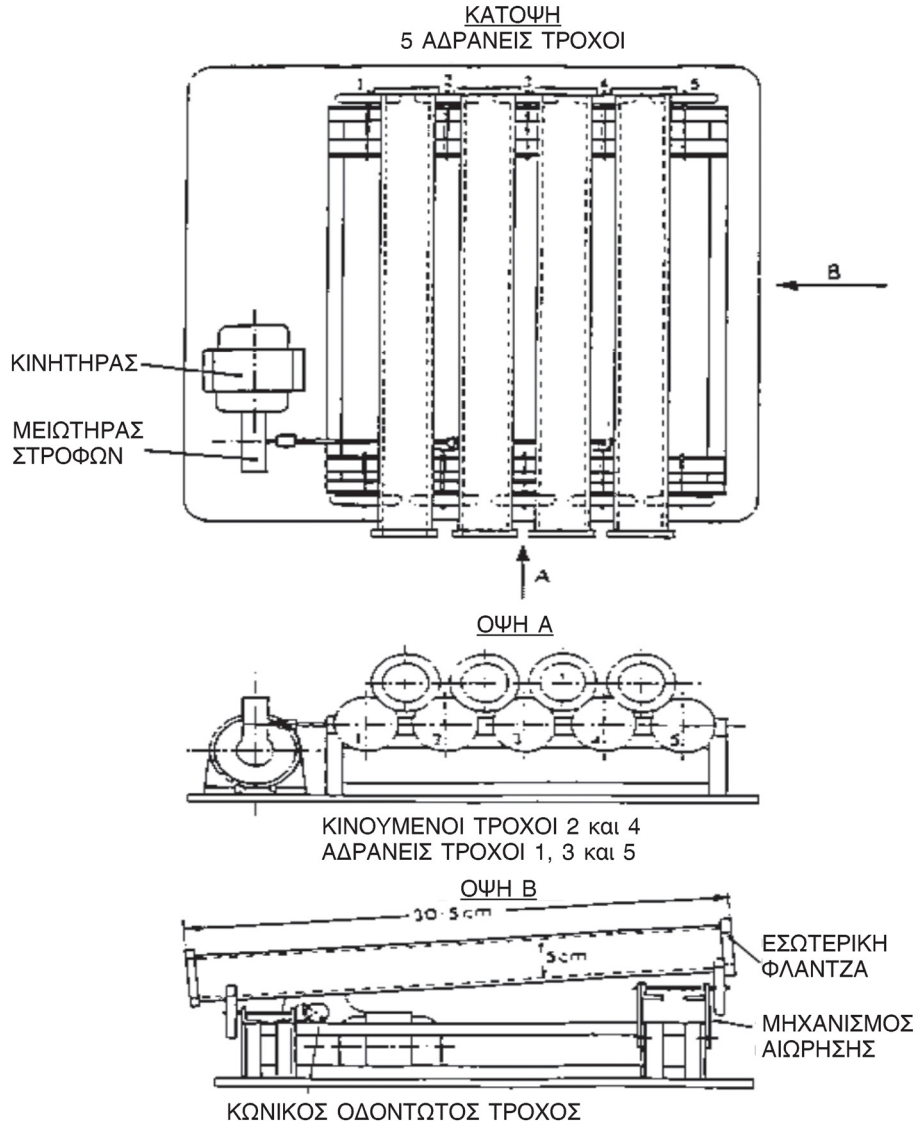
(10) ISO 14593 (1998), Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances, Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

Προσάρτημα 8

Σχήμα 1

Περιστρεφόμενοι σωλήνες



Γλωσσάριο:

Κάτοψη

Όψη A/B

Κινούμενοι τροχοί

Αδρανείς τροχοί

Κινητήρας

Μειωτήρας στροφών

Εσωτερική φλάντζα

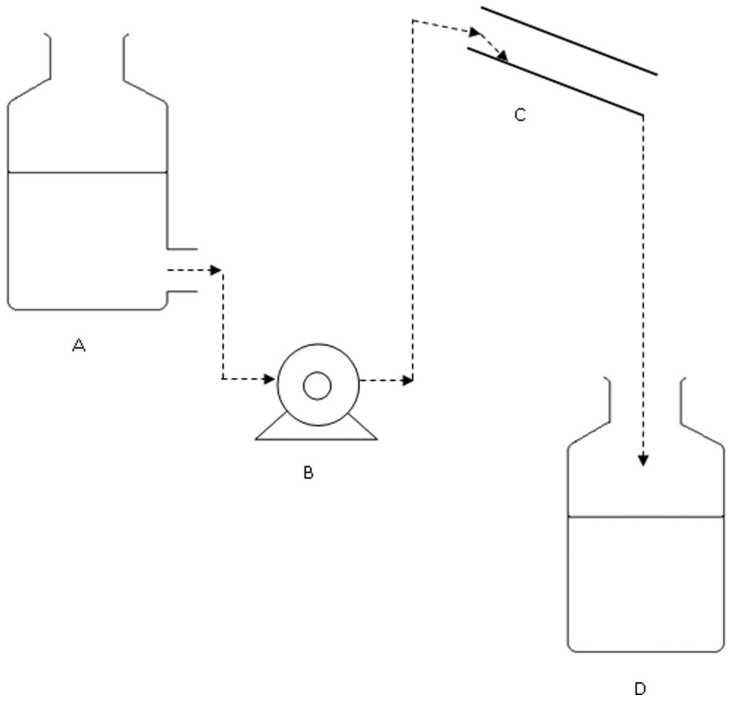
Μηχανισμός αιώρησης

Κωνικός οδοντωτός τροχός

▼**M4**

Σχήμα 2

Διάγραμμα ροής



A: Δεξαμενή τροφοδοσίας

B: Περισταλτική αντλία

C: Περιστρεφόμενος σωλήνας

D: Δοχείο συλλογής εκροών

ΟΡΙΣΜΟΙ:

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Χημικές ουσίες: «Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο όρος “χημική ουσία” χρησιμοποιείται με την ευρεία έννοια στις συμφωνίες της UNCED και στα συνακόλουθα έγγραφα και καλύπτει τις ουσίες, τα προϊόντα, τα μείγματα, τα παρασκευάσματα και κάθε άλλον όρο που μπορεί να χρησιμοποιείται σε υπάρχοντα συστήματα.»

▼B

Γ.11 **ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΙΛΥΣ:**

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΟΗΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με τη μέθοδο που περιγράφεται εκτιμάται η επίδραση μιας ελεγχόμενης ουσίας στους μικροοργανισμούς με μέτρηση της ταχύτητας αναπνοής σε καθορισμένες συνθήκες, με την παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας.

Σκοπός της μεθόδου αυτής είναι να προσφέρει ταχεία μέθοδο εξέτασης με την οποία να είναι δυνατόν να αναγνωριστούν ουσίες που μπορεί να έχουν βλαπτική δράση σε εγκαταστάσεις αερόβιου μικροβιακού καθαρισμού και να προσδιοριστούν κατάλληλες μη ανασταλτικές συγκεντρώσεις των ελεγχόμενων ουσιών για να χρησιμοποιηθούν σε ελέγχους βιοαποικοδομησιμότητας.

Του οριστικού ελέγχου είναι δυνατόν να προηγηθεί δοκιμή προσδιορισμού περιοχής τιμών, η οποία παρέχει πληροφορίες για το εύρος των συγκεντρώσεων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στον καθαυτό έλεγχο.

Το πρωτόκολλο του ελέγχου περιλαμβάνει δύο μάρτυρες χωρίς την ελεγχόμενη ουσία, έναν αρχή και έναν στο τέλος της διαδικασίας ελέγχου. Θα πρέπει επίσης να ελέγχεται κάθε παρτίδα ενεργοποιημένης ιλύος με τη βοήθεια ουσίας αναφοράς.

Η μέθοδος αυτή ισχύει κατ' εξοχήν για ουσίες που είναι πιθανόν να παραμείνουν στο νερό εξαιτίας της διαλυτότητάς τους στο νερό και της χαμηλής πτητικότητάς τους.

Για ουσίες με περιορισμένη διαλυτότητα στα υλικά ελέγχου, ίσως να μην είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η EC_{50}.

Τα αποτελέσματα που βασίζονται στην πρόσληψη οξυγόνου μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα όταν η ελεγχόμενη ουσία έχει την τάση να δρα σαν παράγοντας αποσύζευξης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Για τη διεξαγωγή του ελέγχου είναι χρήσιμα τα ακόλουθα στοιχεία:

— διαλυτότητα στο νερό,

— τάση ατμών

— συντακτικός τύπος,

— καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας.

Σύσταση

Η ενεργοποιημένη ιλύς μπορεί να περιέχει ισχυρούς παθογόνους οργανισμούς και πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Ταχύτητα αναπνοής είναι η κατανάλωση του οξυγόνου των λυμάτων ή των μικροοργανισμών από την αερόβια ιλύ επεξεργασίας και εκφράζεται γενικά σε mg O_2 ανά mg ιλύος ανά ώρα.

▼B

Για να υπολογιστεί η ανασταλτική δράση μιας ελεγχόμενης ουσίας σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση, η ταχύτητα αναπνοής εκφράζεται ως επί τοις εκατό ποσοστό του μέσου όρου των ταχυτήτων αναπνοής των δύο μαρτύρων:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{RC_1 + RC_2}\right) \times 100 = \% \text{ τας εκατό αναστολή}$$

όπου:

R_2 = ταχύτητα κατανάλωσης οξυγόνου στη συγκέντρωση ελέγχου της ελεγχόμενης ουσίας,

RC_1 = ταχύτητα κατανάλωσης οξυγόνου, μάρτυρας C_1.

RC_2 = ταχύτητα κατανάλωσης οξυγόνου, μάρτυρας C_2.

EC_{50} στη μέθοδο αυτή είναι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στην οποία η ταχύτητα αναπνοής είναι 50 % της ταχύτητας που δείχνουν οι μάρτυρες, στις συνθήκες που καθορίζονται στη μέθοδο.

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Συνιστάται η χρησιμοποίηση της 3,5-διχλωροφαινόλης, γνωστού αναστολέα της αναπνοής, σαν ουσίας αναφοράς και ο έλεγχος της ουσίας αυτής για EC_{50} σε κάθε παρτίδα ενεργού ιλύος ως μέσο πιστοποίησης ότι η ευαισθησία της ιλύος είναι κανονική.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Μετριέται η ταχύτητα αναπνοής ενεργού ιλύος, που τροφοδοτείται με πρότυπη ποσότητα θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα, μετά από περίοδο επαφής 30 λεπτών ή τριών ωρών, ή και τα δύο. Μετριέται επίσης η ταχύτητα αναπνοής της ίδια; ενεργού ιλύος παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας σε συνθήκες κατά τα άλλα όμοιες. Η ανασταλτική δράση της δοκιμαζόμενης ουσίας σε συγκεκριμένη συγκέντρωση εκφράζεται σαν επί τοις εκατό ποσοστό του μέσου όρου των ταχυτήτων αναπνοής των δύο μαρτύρων. Η τιμή της EC_{50} υπολογίζεται από προσδιορισμούς σε διάφορες συγκεντρώσεις.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Τα αποτελέσματα του ελέγχου είναι έγκυρα εφόσον:

— οι ταχύτητες αναπνοής στους δύο μάρτυρες απέχουν μεταξύ τους κατά 15 %.

— η EC_{50} (30 λεπτά ή/και 3 ώρες) της 3,5-διχλωροφαινόλης κυμαίνεται μεταξύ των παραδεκτών ορίων 5 και 30 mg/l.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

1.6.1. *Αντιδραστήρια*

1.6.1.1. Διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας

Παρασκευάζονται πρόσφατα διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας στην αρχή της μελέτης με τη βοήθεια μητρικού διαλύματος. Όταν ακολουθείται η διαδικασία που συνιστάται παρακάτω, κατάλληλη είναι μια συγκέντρωση μητρικού διαλύματος 0,5 g/l.

▼B

1.6.1.2. Διάλυμα της ουσίας αναφοράς

Μπορεί λόγου χάριν να παρασκευαστεί διάλυμα 3,5-διχλωροφαινόλης με διάλυση 0,5 g 3,5-διχλωροφαινόλης σε 10 ml NaOH 1M, αραίωση έως τα 30 ml περίπου με απεσταγμένο νερό, προσθήκη H_2SO_4 0,5 M υπό ανάδευση μέχρι να εμφανιστεί ίζημα —θα απαιτηθούν περίπου 8 ml H_2S0_4 0,5 M— και τέλος αραίωση του μείγματος έως το ένα λίτρο με απεσταγμένο νερό. Το pH θα πρέπει τότε να κυμαίνεται μεταξύ 7 και 8.

1.6.1.3. Συνθετικά απόβλητα

Παρασκευάζεται θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα με διάλυση των ακολούθων ποσοτήτων ουσιών σε ένα λίτρο νερού:

— 16 g πεπτόνης,

— 11 g εκχυλίσματος,

— 3 g ουρίας.

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2H_2O$,

— 0,2 g $CaCl_2.7H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4

Σημείωση 1: Τα συνθετικά αυτά απόβλητα είναι εκατό φορές πυκνότερα από αυτά που περιγράφονται στην τεχνική έκθεση του ΟΟΣΑ «Προτεινόμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της βιοαποικοδομησιμότητας των τασιενεργών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα συνθετικά απορρυπαντικά» (11 Ιουνίου 1976), με την προσθήκη όξινου φωσφορικού καλίου.

Σημείωση 2: Στην περίπτωση που το παρασκευασθέν υλικό δεν χρησιμοποιηθεί αμέσως, φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 0 έως 4 °C, για διάστημα όχι μεγαλύτερο της μιας εβδομάδας, υπό συνθήκες που δεν προκαλούν οποιαδήποτε μεταβολή στη σύνθεσή του, Το υλικό μπορεί επίσης να αποστειρωθεί πριν από τη φύλαξή του, ή μπορεί να γίνει η προσθήκη της πεπτόνης και του εκχυλίσματος κρέατος αμέσως πριν τη διεξαγωγή της δοκιμασίας. Πριν τη χρήση γίνεται πλήρης ανάμειξη και ρυθμίζεται το pH.

1.6.2. *Συσκευές και όργανα*

Συσκευή μέτρησης: Το ακριβές σχήμα δεν έχει μεγάλη σημασία. Πάντως, δεν πρέπει να υπάρχει υπερκείμενη αέρια φάση και το ηλεκτρόδιο θα πρέπει να εφαρμόζει στεγανά στο λαιμό της φιάλης μετρήσεως.

Απαιτείται συνηθισμένος εργαστηριακός εξοπλισμός, και κυρίως τα εξής:

— συσκευή μέτρησης,

— διάταξη αερισμού,

— ηλεκτρόδιο και όργανο μέτρησης του pH,

— ηλεκτρόδιο οξυγόνου.

1.6.3. *Παρασκευή τον ενοφθαλμίσματος*

Ως μικροβιακό ενοφθάλμισμα για τον έλεγχο χρησιμοποιείται ενεργοποιημένη ιλύς από εγκατάσταση κατεργασίας αστικών κυρίως αποβλήτων.

Αφού φθάσει στο εργαστήριο η ιλύς, τα χοντρά σωματίδια μπορούν, αν χρειάζεται, να απομακρυνθούν, αφήνοντας το σύστημα σε ηρεμία για λίγο, παραδείγματος χάριν επί 15 λεπτά, και αποχύνεται η υπερκείμενη στιβάδα που αποτελείται από λεπτότερα σωματίδια, προς χρήση. Εναλλακτικά, η ιλύς μπορεί να αναμειχθεί με τη χρήση αναμεικτήρα για διάστημα μερικών δευτερολέπτων.

▼B

Εάν επιπλέον πιστεύεται ότι υπάρχει ανασταλτικό υλικό, η ιλύς πρέπει να πλυθεί με νερό της βρύσης; ή με ένα ισοτονικό διάλυμα. Μετά τη φυγοκέντρηση, αποχύνεται η υπερκείμενη στιβάδα (ή διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τρεις φορές).

Μικρή ποσότητα της ιλύος ζυγίζεται και ξηραίνεται. Από το αποτέλεσμα αυτό είναι δυνατόν να υπολογιστεί η ποσότητα υγρής ιλύος που πρέπει να εναιωρηθεί σε νερό προκειμένου να ληφθεί ενεργοποιημένη ιλύς που θα περιέχει αιωρούμενα στερεά αναμειγμένα με υγρό σε ποσότητα μεταξύ 2 και 4 g/l. Το επίπεδο αυτό συνεπάγεται συγκέντρωση στο υλικό ελέγχου 0,8 έως 1,6 g/l, εφόσον ακολουθηθεί η παρακάτω συνιστώμενη διαδικασία.

Αν δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η ιλύς την ημέρα της συλλογής της, προστίθενται 50 ml συνθετικών αποβλήτων για κάθε λίτρο ενεργοποιημένης ιλύος που έχει παρασκευαστεί όπως προαναφέρθηκε. Το μείγμα αερίζεται όλη τη νύκτα στους 20 ± 2 °C. Στη συνέχεια διατηρείται υπό αερισμό για να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια της ημέρας, Πριν χρησιμοποιηθεί ελέγχεται το pH του και ρυθμίζεται, αν χρειάζεται, μεταξύ 6,0 και 8,0. Τα αιωρούμενα στερεά του αναμειγμένου υγρού προσδιορίζονται όπως περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο.

Αν η ίδια παρτίδα ιλύος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί τις επόμενες ημέρες (μέγιστο όριο τέσσερις ημέρες), στο τέλος κάθε εργάσιμης ημέρας προστίθενται ακόμα 50 ml θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα.

1.6.4. *Διεξαγωγή της δοκιμασίας*

Διάρκεια/περίοδος επαφής:	30 λεπτά ή/και τρεις ώρες, στη διάρκεια των οποίων γίνεται αερισμός
Νερό:	Πόσιμο νερό (αποχλωριωμένο αν χρειάζεται)
Παροχή αέρα:	Καθαρός αέρας απαλλαγμένος από έλαια, ρεύμα αέρα 0,5 έως 1 λίτρο/λεπτό.
Συσκευή μέτρησης:	Φιάλη με επίπεδο πυθμένα όπως π.χ. φιάλη BOD
Μετρητής οξυγόνους:	Κατάλληλο ηλεκτρόδιο οξυγόνου με καταγραφέα
Θρεπτικό διάλυμα:	Συνθετικά απόβλητα (βλέπε παραπάνω)
Ελεγχόμενη ουσία:	Παρασκευάζεται πρόσφατο διάλυμα ελέγχου στην αρχή της δοκιμασίας
Ουσία αναφοράς:	Π.χ. 3,5 — διχλωροφαινόλη (τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις)
Μάρτυρες:	Ενοφθαλμισμένο δείγμα χωρίς ελεγχόμενη ουσία
Θερμοκρασία:	20 ± 2 °C

Στη συνέχεια περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που πρέπει να ακολουθείται τόσο για την ουσία αναφοράς όσο και για την ελεγχόμενη ουσία για την περίοδο επαφής των τριών ωρών:

Χρησιμοποιούνται πολλά δοχεία (π.χ. ποτήρια ζέσεως του 1 λίτρου).

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις που να διαφέρουν μεταξύ τους κατά σταθερό συντελεστή, κατά προτίμηση όχι μεγαλύτερο από 3,2.

Στο χρόνο «0», 16 ml θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα αραιώνονται έως τα 300 ml με νερό. Προστίθενται 200 ml μικροβιακού ενοφθαλμίσματος και το ολικό μείγμα (500 ml) φέρεται στο πρώτο δοχείο (πρώτος μάρτυρας C_1).

▼B

Τα δοχεία του ελέγχου πρέπει να αερίζονται συνεχώς, ώστε το επίπεδο του διαλυμένου O_2 να μην κατέρχεται κάτω των 2,5 mg/l και ώστε η συγκέντρωση του O_2, αμέσως πριν τη μέτρηση της ταχύτητας αναπνοής, να κυμαίνεται γύρω στα 6,5 mg/l.

Στο χρόνο «15 min» (τα 15 λεπτά είναι αυθαίρετο αλλά κατάλληλο χρονικό διάστημα) επαναλαμβάνεται η προηγούμενη διαδικασία, με τη διαφορά ότι προστίθενται 100 ml από το μητρικό διάλυμα της ελεγχόμενης ουσίας στα 16 ml συνθετικών αποβλήτων πριν από την προσθήκη νερού έως τα 300 ml και μικροβιακού εκχυλίσματος μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Το μείγμα αυτό φέρεται σε δεύτερο δοχείο και αερίζεται όπως προαναφέρθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται κατά διαστήματα των 15 λεπτών με διάφορους όγκους μητρικού διαλύματος της ελεγχόμενης ουσίας ώστε να ληφθεί σειρά δοχείων με διάφορες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Τέλος, παρασκευάζεται δεύτερος μάρτυρας (C_2).

Μετά τρεις ώρες μετρείται το pH, και ένα καλό αναμειγμένο δείγμα του περιεχομένου του πρώτου δοχείου μεταγγίζεται στη συσκευή μέτρησης και μετριέται η ταχύτητα αναπνοής για περίοδο 10 λεπτών το πολύ.

Ο προσδιορισμός αυτός επαναλαμβάνεται με το περιεχόμενο κάθε δοχείου ανά 15 λεπτά, έτσι ώστε η περίοδος επαφής να είναι τρεις ώρες για κάθε δοχείο.

Με τον ίδιο τρόπο ελέγχεται η ουσία αναφοράς σε κάθε παρτίδα μικροβιακού ενοφθαλμίσματος.

Θα χρειασθεί διαφορετικό σύστημα (π.χ. περισσότεροι μετρητές οξυγόνου) αν πρόκειται να διεξαχθούν μετρήσεις μετά περίοδο επαφής 30 λεπτών.

Αν απαιτείται μέτρηση της χημικής κατανάλωσης οξυγόνου, ετοιμάζονται πρόσθετα δοχεία που περιέχουν ελεγχόμενη ουσία, θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα και νερό όχι όμως ενεργοποιημένη ιλύ. Η κατανάλωση οξυγόνου μετριέται και σημειώνεται μετά από περίοδο αερισμού 20 λεπτών ή/και τριών ωρών (περίοδος επαφής).

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Η ταχύτητα αναπνοής υπολογίζεται από το σήμα του καταγραφέα σε mg 0_2 ανά λίτρο και ανά ώρα στην περιοχή μεταξύ 6,5 mg O_2/l και 2,5 mg O_2/l περίπου ή για περίοδο 10 λεπτών όταν η ταχύτητα αναπνοής είναι χαμηλή. Το τμήμα της καμπύλης αναπνοής με βάση το οποίο μετριέται η ταχύτητα αναπνοής θα πρέπει να είναι ευθύγραμμο.

Αν οι ταχύτητες αναπνοής των δύο μαρτύρων απέχουν μεταξύ τους περισσότερο από 15 % ή αν η EC_{50} (30 λεπτά ή/και τρεις ώρες) της ουσίας αναφοράς δεν κυμαίνεται μεταξύ των παραδεκτών ορίων (5 και 30 mg/l για την 3,5-διχλωροφαινάνη), ο έλεγχος είναι άκυρος και πρέπει να επαναληφθεί.

Η επί τοις εκατό αναστολή υπολογίζεται σε κάθε συγκέντρωση ελέγχου (βλέπε σημείο 1.2), Η επί τοις εκατό αναστολή παριστάνεται γραφικά σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση, σε ημιλογαριθμικό χαρτί (ή ημιλογαριθμικό χαρτί πιθανότητας). Λαμβάνεται η τιμή EC_{50}.

Είναι δυνατόν να προσδιοριστούν όρια εμπιστοσύνης 95 % για τις τιμές EC_{50} με η βοήθεια πρότυπων μεθόδων.

▼B

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

— Ελεγχόμενη ουσία: δεδομένα χημικής ταυτοποίησης.

— Σύστημα ελέγχου: πηγή, συγκέντρωση και οποιαδήποτε προκατεργασία της ενεργοποιημένης ιλύος.

— Συνθήκες ελέγχου:

  — pH του μείγματος της αντίδρασης πριν τη μέτρηση της αναπνοής,

  — θερμοκρασία ελέγχου,

  — διάρκεια του ελέγχου,

  — ουσία αναφοράς και την EC_{50} που μετρήθηκε γι' αυτήν,

  — αβιοτική πρόσληψη οξυγόνου (αν διαπιστώθηκε).

— Αποτελέσματα:

  — όλα τα αποτελέσματα των μετρήσεων,

  — καμπύλη αναστολής και μέθοδο υπολογισμού της EC_{50}

  — EC_{50} και, αν είναι δυνατόν, στάθμη εμπιστοσύνης 95 %, EC_{20} και EC_{50},

  — όλες οι παρατηρήσεις και οποιαδήποτε παρέκκλιση από την παρούσα μέθοδο ελέγχου που θα μπορούσε να έχει επηρεάσει τα αποτελέσματα.

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η τιμή EC_{50} θα πρέπει να θεωρείται απλός δείκτης της πιθανής τοξικότητας της δοκιμαζόμενης ουσίας είτε για την ενεργοποιημένη ιλύ κατεργασίας αποβλήτων είτε για τους μικροοργανισμούς των λυμάτων, δεδομένου ότι δεν είναι δυνατόν σ' ένα εργαστηριακό έλεγχο, να επιτευχθεί ακριβής προσομοίωση των σύνθετων αλληλεπιδράσεων που σημειώνονται στο περιβάλλον. Επιπλέον, δοκιμαζόμενες ουσίες που μπορούν να έχουν ανασταλτική δράση στην οξείδωση της αμμωνίας μπορούν να σχηματίσουν άτυπες καμπύλες αναστολής. Επομένως η ερμηνεία των καμπυλών αυτών πρέπει να γίνεται προσεκτικά.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) Διεθνές πρότυπο ISO 8192-1986.

(2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, ο. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R. and Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, σ. 245.

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Μέθοδος που συνιστάται αριθ. 103,* η οποία περιγράφεται επίσης από τους:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, α. 80.

(6) Schefer, W., *Textilveredlung,* 6, 1977, σ. 249.

(7) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 209.* απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

▼B

Γ.12 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ SCAS

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της μεθόδου είναι η αξιολόγηση της ενδεχόμενης τελικής βιοαποικοδομησιμότητας υδατοδιαλυτών, μη πτητικών οργανικών ουσιών, όταν εκτίθενται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών εξασφαλίζεται με την καθημερινή προσθήκη διαυγασμένων λυμάτων ως υλικού τροφοδοσίας. (Για τις απαιτήσεις του Σαββατοκύριακου, τα λύματα μπορούν να φυλαχθούν στους 4 °C. Εναλλακτική δυνατότητα είναι η χρησιμοποίηση των συνθετικών λυμάτων της δοκιμασίας επιβεβαίωσης του ΟΟΣΑ.)

Είναι δυνατόν να σημειωθεί φυσικοχημική προσρόφηση των αιωρούμενων στερεών υλών, πράγμα που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (βλέπε σημείο 3.2).

Εξαιτίας του μεγάλου χρόνου κατακράτησης της υγρής φάσης (36 ώρες) και της διακεκομμένης προσθήκης θρεπτικών υλικών, η δοκιμή δεν αποτελεί προσομοίωση των συνθηκών που απαντούν σε μια εγκατάσταση κατεργασίας λυμάτων. Τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με διάφορες ελεγχόμενες ουσίες δείχνουν ότι η δοκιμή διαθέτει υψηλό δυναμικό βιοαποικοδόμησης.

O_2 συνθήκες που παρέχονται από τη δοκιμή είναι πολύ ευνοϊκές για την επιλογή ή/και την προσαρμογή μικροοργανισμών ικανών να αποικοδομήσουν την ελεγχόμενη ένωση. (Η δοκιμή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή εγκλιματισμένων ενοφθαλμισμό των για χρήση σε άλλες δοκιμές.)

Στη μέθοδο αυτή, η μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της τελικής βιοαποικοδομησιμότητας των ελεγχόμενων ουσιών. Είναι προτιμότερο να προσδιορίζεται η τιμή DOC μετά από οξίνιση και καθαρισμό παρά σαν διαφορά μεταξύ $C_{ολικό}$ - $C_{ανόργανο}$.

Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου μπορεί να επιτρέψει να εκτιμηθεί η αρχική αποικοδόμηση της ουσίας (εξαφάνιση της μητρικής χημικής σύνταξης).

Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί μόνο στις ελεγχόμενες οργανικές ουσίες, οι οποίες, στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στη δοκιμή:

— είναι διαλυτές στο νερό (τουλάχιστον 200 mg διαλυμένου οργανικού άνθρακα/l),

— έχουν αμελητέα τάση ατμών,

— δεν ασκούν ανασταλτική δράση στα βακτηρίδια,

— δεν προσροφώνται σημαντικά μέσα στο σύστημα ελέγχου,

— δεν παρουσιάζουν απώλειες μέσω αφρισμού από το διάλυμα ελέγχου.

Η περιεκτικότητα του ελεγχόμενου υλικού σε οργανικό άνθρακα πρέπει να είναι καθορισμένη.

▼B

Τα στοιχεία για τις σχετικές αναλογίες των κυριότερων συστατικών του ελεγχόμενου υλικού είναι χρήσιμο για την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις χαμηλών ή οριακών αποτελεσμάτων.

Τα στοιχεία για την τοξικότητα της ουσίας απέναντι στους μικροοργανισμούς μπορεί να είναι χρήσιμα για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και την επιλογή κατάλληλης συγκέντρωσης για τη δοκιμή.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

C_T = συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, εκφρασμένη σε οργανικό άνθρακα, όπως απαντά ή προστίθεται στα διαυγασμένα λύματα στην αρχή της περιόδου αερισμού (mg/l),

C_t = συγκέντρωση διαλυμένου οργανικού άνθρακα που βρίσκεται στο υπερκείμενο υγρό της μονάδας ελέγχου στο τέλος της περιόδου αερισμού (mg/l),

C_C = συγκέντρωση διαλυμένου οργανικού άνθρακα που βρίσκεται στο υπερκείμενο υγρό του μάρτυρα στο τέλος της περιόδου αερισμού (mg/l).

Στη μέθοδο αυτή, η βιοαποικοδόμηση ορίζεται ως η εξαφάνιση του οργανικού άνθρακα και μπορεί να εκφράζεται ως:

1. το επί τοις εκατό ποσοστό απομάκρυνσης D_{da}, του ποσού της ουσίας που προστίθεται καθημερινά:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_T - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

όπου:

D_{da} = αποικοδόμηση/καθημερινή προσθήκη·

2. το επί τοις εκατό ποσοστό απομάκρυνσης D_{53d} του ποσού της ουσίας που υπάρχει στην αρχή κάθε ημέρας:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (\alpha)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (\beta)]$$

όπου;

D_{ssd} = αποικοδόμηση/ουσία στην αρχή της ημέρας·

οι δείκτες i και (i+1) αναφέρονται στην ημέρα της μέτρησης.

Η εξίσωση 2(α) συνιστάται στην περίπτωση που η τιμή DOC των αποβλήτων μεταβάλλεται από ημέρα σε ημέρα, ενώ η εξίσωση 2(β) μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν η τιμή DOC των αποβλήτων παραμένει σχετικά σταθερή από ημέρα σε ημέρα.

▼B

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν μελετάται μια νέα ουσία, μπορεί να είναι χρήσιμες οι ουσίες αναφοράς παρόλα αυτά δεν συνιστάται στο παρόν έγγραφο καμιά ειδική ουσία αναφοράς.

Παρέχονται δεδομένα για πολλές ενώσεις που έχουν αξιολογηθεί με κυκλικές δοκιμές (βλέπε προσάρτημα 1), κυρίως για να μπορεί να γίνεται βαθμονόμηση της μεθόδου από καιρό σε καιρό και προκειμένου να επιτραπεί η σύγκριση των αποτελεσμάτων όταν χρησιμοποιείται άλλη μέθοδος.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Σεμονάδα ενεργοποιημένης ιλύος ημισυνεχούς λειτουργίας (SCAS) τοποθετείται ενεργοποιημένη ιλύς από εγκατάσταση κατεργασίας λυμάτων. Προτίθενται η ελεγχόμενη ουσία και οικιακά λύματα που έχουν υποστεί καθίζηση και το μείγμα αερίζεται για 23 ώρες. Στη συνέχεια παύει ο αερισμός, η ιλύς αφήνεται να καθιζάνει και το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται.

Η ιλύς που παραμένει στο θάλαμο αερισμού αναμειγνύεται κατόπιν με νέο κλάσμα ελεγχόμενης ουσίας και λυμάτων και ο κύκλος επαναλαμβάνεται.

Η βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται με προσδιορισμό της περιεκτικότητας του υπερκείμενου υγρού σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα. Η τιμή αυτή συγκρίνεται με την τιμή που βρίσκεται στο υγρό που λαμβάνεται από ένα σωλήνα μάρτυρα, στον οποίο έχουν προστεθεί μόνο διαυγασμένα λύματα.

Όταν χρησιμοποιείται ειδική αναλυτική μέθοδος, μπορούν να μετρηθούν σι μεταβολές στη συγκέντρωση του μητρικού μορίου που οφείλεται στη βιοαποικοδόμηση (αρχική βιοαποικοδομησιμότητα).

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου αυτής, που βασίζεται στην απομάκρυνση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα, δεν έχει ακόμη αποδειχθεί. (Όταν εξετάζεται η αρχική βιοαποικοδόμηση, λαμβάνονται δεδομένα μεγάλης ακρίβειας για υλικό που βιοαποικοδομείται σε μεγάλο βαθμό.)

Η ευαισθησία της μεθόδου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις διακυμάνσεις του τυφλού και, σε μικρότερη έκταση, από την ακρίβεια στον προσδιορισμό του διαλυμένου οργανικού άνθρακα καθώς και από τα επίπεδα της ελεγχόμενης ένωσης στο υγρό στην αρχή κάθε κύκλου.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

1.6.1. *Προετοιμασία*

Συναρμολογείται επαρκής αριθμός καθαρών μονάδων αερισμού (εναλλακτική δυνατότητα είναι η χρησιμοποίηση της πρωτότυπης μονάδας ελέγχου SCAS των 1,5 l) και σωλήνων εισαγωγής του αέρα (σχήμα 1) για κάθε ελεγχόμενη ουσία και για τους μάρτυρες. Ο συμπιεσμένος αέρας, που διοχετεύεται στις μονάδες ελέγχου, αφού καθαριστεί με τη βοήθεια ηθμού από φαρμακευτικό βαμβάκι, πρέπει να είναι απαλλαγμένος από οργανικό άνθρακα και να έχει προηγουμένως κορεσθεί με νερό ώστε να ελαττωθούν οι απώλειες που οφείλονται σε εξάτμιση.

Από εγκατάσταση ενεργοποιημένης ιλύος, που επεξεργάζεται κυρίως αστικά λύματα, λαμβάνεται δείγμα ανάμεικτου υγρού με περιεκτικότητα 1 έως 4 g αιωρούμενων στερεών. Για κάθε μονάδα αερισμού απαιτούνται κατά προσέγγιση 150 ml ανάμεικτου υγρού.

▼B

Παρασκευάζονται μητρικά διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας σε απεσταγμένο νερό απαιτείται συνήθως συγκέντρωση 400 mg/l σε οργανικό άνθρακα, που δίνει συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας 20 mg/l σε οργανικό άνθρακα στην αρχή κάθε κύκλου αερισμού, εφόσον δεν σημειώνεται καθόλου βιοαποικοδόμηση.

Επιτρέπονται και υψηλότερες συγκεντρώσεις, εφόσον το επιτρέπει η τοξικότητα απέναντι στους μικροοργανισμούς.

Μετράται η περιεκτικότητα των μητρικών διαλυμάτων σε οργανικό άνθρακα.

1.6.2. *Συνθήκες της δοκιμής*

Η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται στους 20 έως 25 ºC

Χρησιμοποιείται υψηλή συγκέντρωση αερόβιων μικροοργανισμών (από I έως 4 g/l αιωρούμενων στερεών υλών) και ο πραγματικός χρόνος κατακράτησης είναι 36 ώρες. Το ανθρακούχο υλικό στα λύματα τροφοδότησης οξειδώνεται εξαντλητικά, συνήθως μέσα σε οκτώ ώρες μετά την έναρξη κάθε κύκλου αερισμού. Στη συνέχεια, η ιλύς αναπνέει ενδογενώς για το υπόλοιπο της περιόδου αερισμού, διάστημα κατά το οποίο το μόνο διαθέσιμο υπόστρωμα είναι η ελεγχόμενη ένωση, εκτός εάν και αυτή μεταβολίζεται εύκολα. Τα χαρακτηριστικά αυτά, σε συνδυασμό με τον καθημερινό επανεμβολιασμό του ελέγχου με εμβόλιο από αστικά λύματα, παρέχουν εξαιρετικά ευνοϊκές συνθήκες τόσο για εγκλιματισμό όσο και για μεγάλους βαθμούς βιοαποικοδόμησης.

1.6.3. *Εκτέλεση της δοκιμασίας*

Λαμβάνεται δείγμα ανάμεικτου υγρού από κατάλληλη εγκατάσταση ενεργοποιημένης ιλύος επεξεργασίας αστικών κυρίως λυμάτων ή εργαστηριακή μονάδα και διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες μέχρι να χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο. Σε κάθε μονάδα αερισμού καθώς και στη μονάδα μάρτυρα μεταφέρονται 150 ml (όταν χρησιμοποιείται η πρωτότυπη μονάδα ελέγχου SCAS, να πολλαπλασιάζονται οι αναφερόμενοι όγκοι επί 10) ανάμεικτου υγρού και αρχίζει ο αερισμός, Μετά από 23 ώρες ο αερισμός σταματά και η ιλύς αφήνεται να καθιζάνει για 45 λεπτά. Ανοίγεται η στρόφιγγα κάθε δοχείου με τη σειρά και αφαιρούνται ποσότητες 100 ml από το υπερκείμενο υγρό. Λαμβάνεται δείγμα διαυγασμένων αστικών λυμάτων αμέσως πριν από τη χρήση και 100 ml από αυτό προστίθενται στην ιλύ που έχει απομείνει σε κάθε μονάδα αερισμού, Αρχίζει πάλι ο αερισμός. Στο στάδιο αυτό δεν προστίθενται ελεγχόμενα υλικά και οι μονάδες τροφοδοτούνται καθημερινά μόνο με αστικά λύματα, μέχρι να ληφθεί καθαρό υπερκείμενο υγρό μετά την καθίζηση. Η διαδικασία αυτή απαιτεί συνήθως δύο εβδομάδες, στο τέλος των οποίων ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας που περιέχεται στο υπερκείμενο υγρό στο τέλος κάθε κύκλου αερισμού πλησιάζει μια σταθερή τιμή.

Στο τέλος της περιόδου αυτής αναμειγνύονται οι επιμέρους διαυγασμένες ιλύες και σε κάθε μονάδα προστίθενται 50 ml της προκύπτουσας σύνθετης ιλύος.

Στις μονάδες μάρτυρες προστίθενται 100 ml διαυγασμένων λυμάτων, ενώ στις μονάδες ελέγχου 95 ml συν 5 ml από το κατάλληλο μητρικό διάλυμα της ελεγχόμενης ουσίας (400 mg/l). Αρχίζει πάλι ο αερισμός, που συνεχίζεται για 23 ώρες. Η ιλύς αφήνεται κατόπιν να καθιζάνει για 45 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται και αναλύεται για την περιεκτικότητά του σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα.

Η παραπάνω διαδικασία πλήρωσης και αφαίρεσης επαναλαμβάνεται καθημερινά σε όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας.

▼B

Πριν από την καθίζηση είναι πιθανόν να χρειαστεί καθαρισμός των τοιχωμάτων των μονάδων, ώστε να αποτραπεί η συσσώρευση στερεών υλών πάνω από τη στάθμη του υγρού, Για κάθε μονάδα χρησιμοποιείται διαφορετικό ξέστρο ή ψήκτρα, ώστε να αποφευχθεί η αλληλομόλυνση.

Θεωρητικά, ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας στα υπερκείμενα υγρά προσδιορίζεται καθημερινά, παρόλο που επιτρέπονται και λιγότερο συχνές αναλύσεις. Πριν από την ανάλυση, τα υγρά διηθούνται μέσω διηθητικών μεμβρανών των 0,45 μm, που έχουν υποστεί έκπλυση ή φυγοκεντρούνται. Οι διηθητικές μεμβράνες είναι κατάλληλες, εφόσον εξασφαλίζεται ότι δεν ελευθερώνουν άνθρακα ούτε προσροφούν την ουσία στο στάδιο της διήθησης. Η θερμοκρασία του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 40 °C, όταν αυτό βρίσκεται στη φυγόκεντρο.

Η διάρκεια της δοκιμασίας για ουσίες που παρουσιάζουν μικρή ή δεν παρουσιάζουν καθόλου βιοαποικοδόμηση είναι απροσδιόριστη, αλλά από την πείρα προκύπτει ότι θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 12 εβδομάδες κατά κανόνα, όχι όμως μεγαλύτερη από 26 εβδομάδες.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Χαράσσεται καμπύλη των τιμών του διαλυμένου οργανικού άνθρακα στα υπερκείμενα υγρά των μονάδων ελέγχου και των μονάδων μαρτύρων συναρτήσει του χρόνου.

Όταν ολοκληρώνεται η βιοαποικοδόμηση, τα επίπεδα που βρίσκονται στη μονάδα ελέγχου τείνουν να πλησιάσουν τα επίπεδα του μάρτυρα. Μόλις διαπιστωθεί ότι η διαφορά μεταξύ των δύο επιπέδων είναι σταθερή επί τρεις διαδοχικές μετρήσεις, εκτελούνται τόσες περαιτέρω μετρήσεις όσες αρκούν για να επιτρέψουν τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων και υπολογίζεται η επί τοις εκατό βιοαποικοδόμηση της ελεγχόμενης ένωσης (D_{da} ή D_{ssd}, βλέπε σημείο 1.2).

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η έκθεση των αποτελεσμάτων της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει:

— κάθε πληροφορία για το είδος των λυμάτων, τον τύπο της μονάδας που χρησιμοποιήθηκε και τα πειραματικά αποτελέσματα σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, την ουσία αναφοράς, εφόσον χρησιμοποιήθηκε, και τον τυφλό προσδιορισμό,

— τη θερμοκρασία,

— την καμπύλη απομάκρυνσης με περιγραφή, του τρόπο υπολογισμού (βλέπε σημείο 1.2).

— την ημερομηνία και την τοποθεσία της δειγματοληψίας για την ενεργοποιημένη ιλύ και τα λύματα, την κατάσταση προσαρμογής, τη συγκέντρωση κλπ.,

— τους επιστημονικούς λόγους για τυχόν αλλαγές στην πειραματική διαδικασία,

— υπογραφή και ημερομηνία.

▼B

3.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δεδομένου ότι η ουσία που πρόκειται να ελεγχθεί με τη μέθοδο αυτή δεν μπορεί εύκολα να βιοαποικοδομηθεί, οποιαδήποτε απομάκρυνση DOC οφειλόμενη αποκλειστικά σε βιοαποικοδόμηση θα είναι κανονικά σταδιακή σε διάστημα ημερών ή εβδομάδων, εκτός από τις περιπτώσεις κατά τις οποίες εκδηλώνεται αιφνίδιος εγκλιματισμός, πράγμα που φαίνεται από μια ραγδαία εξαφάνιση μετά από μερικές εβδομάδες.

Η φυσικοχημική ωστόσο προσρόφηση μπορεί μερικές φορές να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο αυτό φαίνεται με την πλήρη ή μερική απομάκρυνση του DOC που έχει προστεθεί στην αρχή. Το τι θα συμβεί κατόπιν εξαρτάται από παράγοντες όπως οι βαθμοί προσρόφησης και η συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών στα απόβλητα που αποχύνονται. Συνήθως, η διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων DOC στα υπερκείμενα υγρά του μάρτυρα και της μονάδας ελέγχου αυξάνεται σταδιακά από την αρχικά χαμηλή τιμή και η διαφορά αυτή παραμένει κατόπιν στα νέα επίπεδα για το υπόλοιπο μέρος του πειράματος, εκτός αν συμβεί εγκλιματισμός.

Για να γίνει διάκριση ανάμεσα στη βιοαποικοδόμηση (ή τη μερική βιοαποικοδόμηση) και την προσρόφηση απαιτούνται περισσότερα πειράματα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, ο πειστικότερος όμως είναι να χρησιμοποιηθεί το υπερκείμενο υγρό ή η ιλύς ως ενοφθάλμισμα σε μια δοκιμασία βασικής σειράς (base-set test) (κατά προτίμηση δοκιμασία αναπνοομετρίας).

Οι ελεγχόμενες ουσίες που παρουσιάζουν μεγάλη, μη οφειλόμενη σε προσρόφηση απομάκρυνση του DOC στη δοκιμασία αυτή, θα πρέπει να θεωρούνται ως ισχυρά βιοαποικοδομήσιμες. Η μερική, μη οφειλόμενη σε προσρόφηση απομάκρυνση δείχνει ότι η χημική ένωση επιδέχεται βιοαποικοδόμηση τουλάχιστον ως ένα βαθμό.

Η χαμηλή ή μηδενική απομάκρυνση DOC μπορεί να οφείλεται σε αναστολή των μικροοργανισμών από την ελεγχόμενη ουσία, και αυτό μπορεί επίσης να φανεί με τη λύση και την απώλεια ιλύος, που οδηγεί σε θολά υπερκείμενα υγρά. Η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί με χαμηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας.

Η χρήση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου ή σημασμένης ελεγχόμενης ουσίας με ισότοπο ^{14}C μπορεί να επιτρέψει μεγαλύτερη ευαισθησία. Στην περίπτωση ελεγχόμενης ουσίας με ^{14}C, η ανάκτηση του $^{14}C0_2$ επιβεβαιώνει ότι έχει σημειωθεί βιοαποικοδόμηση.

Όταν τα αποτελέσματα εκφράζονται σε αρχική βιοαποικοδόμηση, θα πρέπει, αν είναι δυνατόν, να επεξηγείται η αλλαγή στη χημική σύνταξη, που οδηγεί σε απώλεια της απόκρισης της μητρικής ελεγχόμενης ουσίας.

Η εγκυρότητα της αναλυτικής μεθόδου πρέπει να αναφέρεται μαζί με την απόκρισή της κατά τον προσπορισμό της στον τυφλό έλεγχο.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1982, *Test Guideline 302 A,* απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

▼B

Προσάρτημα 1

Δοκιμασία SCAS: παράδειγμα αποτελεσμάτων

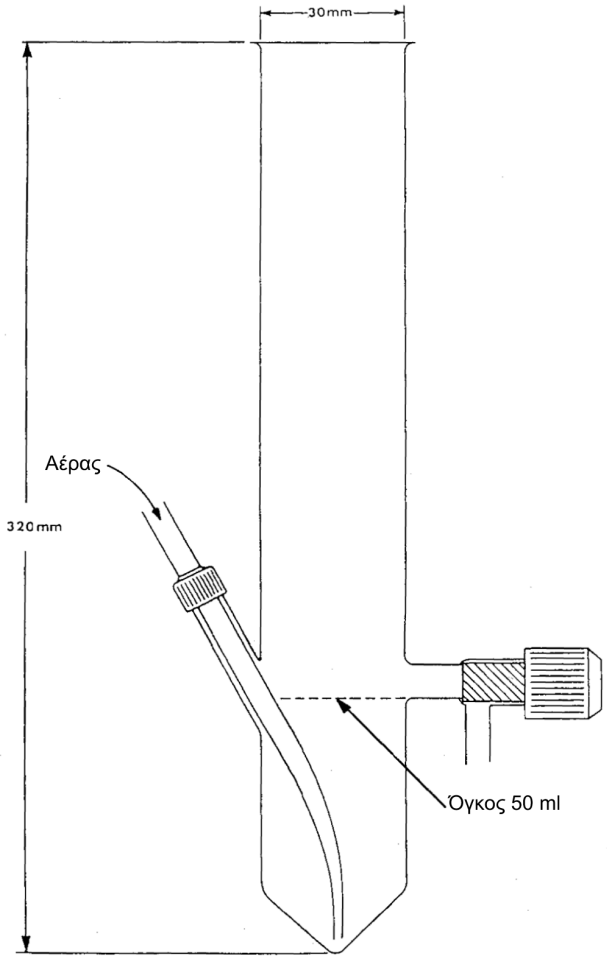
Ουσία	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Εκατοστιαίο ποσοστό βιοαποικοδόμησης D_{da}	Διάρκεια δοκιμασίας (ημέρες)
Θειικό άλας του 4-ακετυλο-αμινοβενζολίου	17,2	2,0	85	40
Θειικό άλας του τετρα-προπυλενο-βενζολίου	17,3	8,4	51,4	40
4-Νιτροφαινόλη	16,9	0,8	95,3	40
Διαιθυλενογλυκόλη	16,5	0,2	98,8	40
Ανιλίνη	16,9	1,7	95,9	40
Τετρα-καρβοξυλικό άλας του κυκλοπεντανίου	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Προσάρτημα 2

Παράδειγμα συσκευής δοκιμασίας

Σχήμα 1



▼B

Γ.13. ΒΙΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ: ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΨΑΡΙΑ ΜΕ ΣΥΝΕΧΗ ΡΟΗ ΝΕΡΟΥ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μέθοδος αυτή βιοσυγκέντρωσης αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 305 (1996).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη μέθοδο αυτή περιγράφεται διαδικασία για τον προσδιορισμό της δυνητικής βιοσυγκέντρωσης ουσιών σε ψάρια υπό συνθήκες συνεχούς ροής νερού. Αν και η διαδικασία της δοκιμής υπό συνεχή ροή νερού είναι κατά πολύ προτιμότερη, επιτρέπεται η χρήση και ημιστατικών διαδικασιών υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας.

Η μέθοδος περιλαμβάνει επαρκή στοιχεία για την εκτέλεση της δοκιμής, αφήνοντας ταυτόχρονα ικανή ελευθερία για την προσαρμογή του σχεδιασμού του πειράματος στις συνθήκες που επικρατούν στα διάφορα εργαστήρια και στα ποικίλα χαρακτηριστικά των προς δοκιμή ουσιών. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα έγκυρη στην περίπτωση σταθερών οργανικών χημικών ουσιών με τιμές log P_{ow} μεταξύ 1,5 και 6,0 (1), μπορεί όμως να εφαρμοστεί και σε υπερλιπόφιλες ουσίες (με τιμή log P_{ow} > 6,0). Η τιμή του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης (ΣΒΣ), ο οποίος μερικές φορές συμβολίζεται με K_B, για τις υπερλιπόφιλες αυτές ουσίες. είναι υποθετικά, όταν γίνεται εκ των προτέρων εκτίμηση αυτής, υψηλότερη από την τιμή του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση ($ΣΒΣ_{OK}$) που αναμένεται να βρεθεί από τα εργαστηριακά πειράματα. Προεκτιμήσεις του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης για οργανικές χημικές ουσίες με τιμές log P_{ow} μέχρι περίπου 9,0 μπορούν να γίνουν χρησιμοποιώντας την εξίσωση των Bintein et al. (2). Στις παραμέτρους που χαρακτηρίζουν τη δυνητικότητα βιοσυγκέντρωσης περιλαμβάνεται η σταθερά ρυθμού πρόσληψης (k_1), η σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2) και ο ($ΣΒΣ_{OK}$).

Η ανάλυση δειγμάτων νερού και ψαριών μπορεί να διευκολυνθεί με ραδιοϊχνηθετημένες υπό δοκιμή ουσίες αφού αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαπιστωθεί αν θα πρέπει να γίνει ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός προϊόντων αποικοδόμησης. Εάν γίνει μέτρηση του συνόλου των ραδιενεργών υπολειμμάτων (π.χ. με καύση ή διαλυτοποίηση των ιστών), ο ΣΒΣ βασίζεται στη γονική ουσία, σε τυχόν κατακρατούμενους μεταβολίτες καθώς επίσης και σε τυχόν αφομοιωμένο άνθρακα. Επομένως, τιμές ΣΒΣ που βασίζονται στο σύνολο των ραδιενεργών υπολειμμάτων δεν μπορούν να συγκριθούν απευθείας με τιμές ΣΒΣ που προέρχονται από ειδική χημική ανάλυση μόνον των γονικών ουσιών.

Στις μελέτες με ραδιοϊχνηθετημένες ουσίες, για τον προσδιορισμό του ΣΒΣ που βασίζεται στη γονική ένωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ορισμένες διαδικασίες καθαρισμού, ενώ, εφόσον θεωρηθεί αναγκαίο, μπορούν να εντοπιστούν και οι βασικοί μεταβολίτες. Επίσης, είναι δυνατόν να γίνει ένας συνδυασμός μελέτης μεταβολισμού ψαριών με μελέτη βιοσυγκέντρωσης με ανάλυση και ταυτοποίηση των υπολειμμάτων στους ιστούς.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Βιοσυγκέντρωση/βιοσυσσώρευση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας σε ένα ή επί ενός οργανισμού (σε συγκεκριμένους ιστούς του) σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσο.

Συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (ΣΒΣ ή K_B) σε οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης της δοκιμής αυτής συσσώρευσης είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα/επί των ψαριών ή συγκεκριμένους ιστούς τους [C_f σε μg/g (ppm)] διηρημένη διά* της συγκεντρώσεως της χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο [C_u σε μg/ml (ppm)].

▼B

Ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης σταθερή; κατάσταση; ($ΣΒΣ_{ακ}$ ή K_B) δεν αλλάζει σημαντικά για μία παρατεταμένη περίοδο, ενώ ταυτόχρονα η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσον είναι σταθερή κατά τη διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου.

Σταθερή κατάσταση στη γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια (C_f) συναρτήσει του χρόνου επιτυγχάνεται όταν η καμπύλη καθίσταται παράλληλη με τον άξονα του χρόνου και τρεις διαδοχικοί προσδιορισμοί της C_f σε δείγματα ληφθέντα ανά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών δεν διαφέρουν μεταξύ τους σε ποσοστό μεγαλύτερο από ± 20 %. χωρίς όμως να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών περιόδων δειγματοληψίας. Όταν αναλύονται συγκεντρωτικά δείγματα, απαιτούνται τουλάχιστον τέσσερις διαδοχικές αναλύσεις. Στην περίπτωση προς δοκιμή ουσιών που προσλαμβάνονται με αργό ρυθμό, τα διαστήματα αντιστοιχούν κατά προτίμηση σε επτά ημέρες.

Συντελεστής βιοσυγκέντρωσης που υπολογίζονται απευθείας από σταθερές ρυθμού κινητικής (k_1/k_2) χαρακτηρίζονται ως συντελεστές συγκέντρωσης κινητικής, ΣΒΣ

Συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού (P_{ow}) είναι ο λόγος της διαλυτότητας μίας χημικής ουσίας σε n-οκτανόλη και νερό σε κατάσταση ισορροπίας (μέθοδος Α.8), συμβολιζόμενος επίσης και ως K_{ow}. Ο λογάριθμος του P_{ow} χρησιμοποιείται ως ένδειξη της δυνητικότητας βιοσυγκέντρωσης μίας χημικής ουσίας σε υδρόβιους οργανισμούς.

Έκθεση ή φάση πρόσληψης είναι ο χρόνος κατά τη διάρκεια του οποίου τα ψάρια εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία.

Σταθερά ρυθμού πρόσληψης (k_1) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει τον ρυθμό αύξησης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα/επί των υπό δοκιμή ψαριών (ή σε συγκεκριμένους ιστούς τους) όταν τα ψάρια εκτίθενται στη χημική αυτή ουσία (η k_1 εκφράζεται σε ημέρα-4:).

Φάση μεταέκθεσης ή αποβολής (απώλειας) είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο, έπειτα από τη μεταφορά των υπό δοκιμή ψαριών από ένα μέσο που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία σε μέσο απαλλαγμένο της ουσίας αυτής, μελετάται η αποβολή (ή η καθαρή απώλεια) της ουσίας από τα υπό δοκιμή ψάρια (ή τους συγκεκριμένους ιστούς τους).

Σταθερά ρυθμού αποβολής (απώλειας) (k_2) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει το ρυθμό της μείωσης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα υπό δοκιμή ψάρια (ή τους συγκεκριμένους ιστούς τους) μετά τη μεταφορά των υπό δοκιμή ψαριών από μέσο που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία σε μέσο απαλλαγμένο της ουσίας αυτής (η k_2 εκφράζεται σε ημέρα^{-1}).

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η δοκιμή αποτελείται από δύο φάσεις: Τη φάση της έκθεσης (πρόσληψης) και τη φάση της μεταέκθεσης (αποβολής). Κατά τη διάρκεια της φάσης της πρόσληψης. ξεχωριστές ομάδες ψαριών ενός είδους εκτίθενται σε δύο τουλάχιστον συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας. Κατόπιν, οι ομάδες των ψαριών μεταφέρονται σε μέσο απαλλαγμένο της υπό δοκιμή ουσίας για τι] φάση της αποβολής. Η φάση της αποβολής οπωσδήποτε εκτός και αν η πρόσληψη της ουσίας κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης είναι ασήμαντη (π.χ. ο ΣΒΣ είναι μικρότερος του 10). Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα/επί των ψαριών (ή τους συγκεκριμένους ιστούς τους) παρακολουθείται κατά τη διάρκεια και των δύο φάσεων της δοκιμής. Εκτός από τις δύο αυτές ομάδες, μία ομάδα-μάρτυρας ψαριών διατηρείται υπό τις ίδιες συνθήκες εκτός της απουσίας της υπό δοκιμή ουσίας για να γίνει συσχετισμός πιθανών δυσμενών επιδράσεων που παρατηρούνται στη δοκιμή βιοσυγκέντρωσης με μία αντίστοιχη ομάδα-μάρτυρα και για να βρεθούν τυχόν προϋπάρχουσες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας.

▼B

Η φάση της πρόσληψης διαρκεί 28 ημέρες εκτός κι αν αποδεδειγμένα επιτευχθεί νωρίτερα ισορροπία. Μία πρόβλεψη ως προς τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης και τον χρόνο επίτευξης σταθερής κατάστασης μπορεί να γίνει με την εξίσωση του παραρτήματος 3. Κατόπιν αρχίζει η περίοδος αποβολής με μεταφορά των ψαριών στο ίδιο μέσο αλλά χωρίς την υπό δοκιμή ουσία σε άλλο καθαρό δοχείο. Εφόσον είναι δυνατό, ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης υπολογίζεται κατά προτίμηση τόσον ως ο λόγος ($ΣΒΣ_{ok}$), της συγκέντρωσης στα ψάρια (C_f) και στο νερό (C_w) σε φαινομενική σταθερή κατάσταση όσο και ως συντελεστής κινητικής βιοσυγκέντρωσης, $ΣΒΣ_κ$ δηλαδή ως ο λόγος των σταθερών ρυθμού πρόσληψης (k_1) και αποβολής (k_2), υποτιθεμένου ότι η κινητική είναι πρώτης τάξεως. Εάν είναι προφανές ότι η κινητική δεν είναι πρώτης τάξεως, τότε πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο περίπλοκα μοντέλα (παράρτημα 5)

Εάν μέσα σε 28 ημέρες δεν επιτευχθεί σταθερή κατάσταση, η φάση της πρόσληψης θα πρέπει να παρατείνεται μέχρις ότου επιτευχθεί σταθερή κατάσταση ή μέχρι 60 ημέρες, όποιο από τα δύο συμβεί πρώτο, κατόπιν δε αρχίζει η φάση της αποβολής.

Η σταθερά ρυθμού πρόσληψης, η σταθερά ρυθμού αποβολής (απώλειας) (ή οι σταθερές, αν χρησιμοποιούνται πιο πολύπλοκα μοντέλα), ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης και, όπου είναι δυνατόν, τα όρια εμπιστοσύνης καθεμίας από τις παραμέτρους αυτές υπολογίζονται από το μοντέλο που περιγράφει καλύτερα τις μετρούμενες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια και το νερό.

Ο ΣΒΣ εκφράζεται ως συνάρτηση του συνολικού υγρού βάρους των ψαριών. Εντούτοις, για ειδικούς λόγους μπορούν να χρησιμοποιηθούν και συγκεκριμένοι ιστοί ή όργανα (π.χ. μυς, συκώτι), εάν τα ψάρια είναι αρκετά μεγάλα ή μπορούν να χωριστούν σε εδώδιμα (φιλέτο) και μη εδώδιμα (εντόσθια) τμήματα. Δεδομένου ότι στην περίπτωση πολλών οργανικών ουσιών υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ δυνητικότητας βιοσυγκέντρωσης και λιποφιλικότητας, υπάρχει και αντίστοιχη σχέση μεταξύ του λιπιδικού περιεχομένου των υπό δοκιμή ψαριών και της παρατηρούμενης βιοσυγκέντρωσης των ουσιών αυτών. Έτσι. για την υποβάθμιση της πηγής αυτής διαφορών στα αποτελέσματα δοκιμών σε ουσίες με υψηλή λιποφιλικότητα (δηλαδή με $\log P_{ow} > 3$), η βιοσυγκέντρωση θα πρέπει να εκφράζεται, πέραν του συνολικού σωματικού βάρους, και σε σχέση με το λιπιδικό περιεχόμενο.

Το λιπιδικό περιεχόμενο δα πρέπει να προσδιορίζεται στο ίδιο βιολογικό υλικό με εκείνο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης τη; υπό δοκιμή ουσίας, όταν είναι εφικτό.

1.4. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

Πριν πραγματοποιηθεί η δοκιμή για τη βιοσυγκέντρωση, θα πρέπει να είναι γνωστά τα ακόλουθα στοιχεία για την ουσία:

α) υδατοδιαλυτότητα

β) συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού P_{ow} (συμβολιζόμενος επίσης και ως K_{ow} και προσδιοριζόμενος με μέθοδο HPLC στο Α.8)

γ) υδρόλυση

δ) φωτομετασχηματισμός στο νερό προσδιορισμένος υπό ηλιακή ή προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία και υπό τις συνθήκες ακτινοβολίας στη δοκιμή για τη βιοσυγκέντρωση (3)

▼B

ε) επιφανειακή τάση (δηλαδή για ουσίες στις οποίες δεν μπορεί να προσδιοριστεί ο log P_{ow})

στ) τάση ατμών

ζ) άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (όπου ενδείκνυται).

Άλλα απαιτούμενα στοιχεία είναι η τοξικότητα για το είδος των ψαριών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή, κατά προτίμηση η ασυμπτωτική LC_{50} (δηλαδή ανεξάρτητα του χρόνου). Πρέπει να υπάρχει διαθέσιμη κατάλληλη αναλυτική μέθοδος, γνωστής ορθότητας (accuracy), ακρίβειας (precision) και ευαισθησίας, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή ουσίας στα διαλύματα δοκιμή; και σε βιολογικό υλικό, καθώς και στοιχεία για την παρασκευή και αποθήκευση του δείγματος. Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστό το αναλυτικό όριο ανίχνευσης της προς δοκιμή ουσίας τόσο στο νερό όσο και στους ιστούς των ψαριών. Όταν για τη δοκιμή χρησιμοποιείται επισημασμένη με ^{14}C ουσία, θα πρέπει να είναι γνωστό το ποσοστό της ραδιενέργειας που οφείλεται σε προσμείξεις.

1.5 ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για να είναι έγκυρη μία δοκιμή, θα πρέπει να επικρατούν οι ακόλουθες συνθήκες:

— η διακύμανση στη θερμοκρασία να είναι μικρότερη από ± 2 °C

— η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου να μην πέφτει κάτω από το 60 % της συγκέντρωσης κορεσμού

— η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στους θαλάμους να διατηρείται στο ± 20 % του μέσου όρου των τιμών που μετρώνται κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης

— η θνησιμότητα ή άλλα δυσμενή φαινόμενα/ασθένειες τόσο στα ψάρια-μάρτυρες όσο και στα ψάρια της δοκιμής να είναι μικρότερη του 10 % στο τέλος της δοκιμής. Όταν η δοκιμή παρατείνεται για κάποιες εβδομάδες ή μήνες, η θνησιμότητα ή άλλα δυσμενή φαινόμενα και στις δύο σειρές ψαριών θα πρέπει να είναι μικρότερη από 5 % το μήνα και να μην υπερβαίνει το 30 % συνολικά.

1.6. ΕΝΩΣΕΙΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για τον έλεγχο, εφόσον απαιτείται, της πειραματικής διαδικασίας μπορεί να είναι χρήσιμη η χρησιμοποίηση ενώσεων αναφοράς γνωστής δυνητικότητας βιοσυγκέντρωσης. Εντούτοις, δεν μπορούν ακόμη να γίνουν συστάσεις για κάποιες συγκεκριμένες ουσίες.

1.7 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.7.1. *Εξοπλισμός*

Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να αποφεύγεται η χρήση υλικών, σε οποιοδήποτε τμήμα του εξοπλισμού, τα οποία μπορεί να διαλυθούν, προσροφηθούν ή αποπλυθούν και να έχουν δυσμενή επίδραση στα ψάρια. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθεις ορθογώνιες ή κυλινδρικές δεξαμενές, κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό και με κατάλληλη χωρητικότητα ανάλογα με το ρυθμό πληρώσεως. Θα πρέπει να αποφεύγεται όσο το δυνατόν η χρήση μαλακών πλαστικών σωληνώσεων. Προτιμάται η χρήση σωληνώσεων από τεφλόν (R). ανοξείδωτο χάλυβα ή και γυαλί. Η εμπειρία έχει δείξει ότι στην περίπτωση ουσιών με μεγάλους συντελεστές προσροφήσεως. όπως τα συνθετικά πυρεθροειδή. μπορεί να απαιτείται η χρήση σιλανιωμένου γυαλιού. Στις περιπτώσεις αυτές ο εξοπλισμός, μετά τη χρήση, πρέπει να απορρίπτεται.

▼B

1.7.2. *Νερό*

Στις δοκιμές χρησιμοποιείται γενικά φυσικό νερό το οποίο όμως πρέπει να λαμβάνεται από πηγές που να μην είναι μολυσμένες και να παρέχουν νερό ομοιόμορφης ποιότητας. Το νερό για τις αραιώσεις πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε το επιλεγμένο είδος ψαριού να μπορεί να επιβιώνει καθ' όλη τη διάρκεια του εγκλιματισμού και της δοκιμής χωρίς να παρουσιάζει οποιαδήποτε ανώμαλη εμφάνιση ή συμπεριφορά. Η ιδανική περίπτωση θα ήταν να μπορεί να αποδεικνύεται ότι το είδος αυτό του ψαριού μπορεί να επιζήσει, να αναπτυχθεί και να αναπαραχθεί στο νερό της αραίωσης (π.χ. με καλλιέργεια στο εργαστήριο ή με δοκιμή τοξικότητας για τον κύκλο της ζωής του). Το νερό θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον από το pH, τη σκληρότητα, τα ολικά στερεά, το συνολικό οργανικό άνθρακα καθώς επίσης, κατά προτίμηση, και από το αμμώνιο, τα νιτρώδη και την αλκαλικότητα και, για τα θαλάσσια είδη την αλατότητά του. Οι παράμετροι που παίζουν σημαντικό ρόλο στην άριστη διαβίωση των ψαριών είναι απόλυτα γνωστοί, στο παράρτημα 1 όμως δίνονται ορισμένες συνιστώμενες μέγιστες συγκεντρώσεις για ορισμένες παραμέτρους γλυκού και θαλασσινού νερού για τις δοκιμές.

Κατά τη διάρκεια μίας δοκιμής το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Η τιμή του pH θα πρέπει να είναι στην περιοχή από 6,0 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μίας δεδομένης δοκιμής δεν πρέπει να κυμαίνεται πέραν των ± 0,5 μονάδων pH. Για να διασφαλίζεται ότι το νερό της αραίωσης δεν θα επηρεάσει ατόπως το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ., δημιουργώντας σύμπλοκα με την υπό δοκιμή ουσία) ή δεν θα επηρεάσει δυσμενώς τη συμπεριφορά των ψαριών, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν ένα νερό είναι γνωστό ότι είναι σχετικά σταθερό από πλευράς ποιότητας θα πρέπει, π.χ., κάθε τρεις μήνες, να γίνεται προσδιορισμός βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO,), γεωργικών φαρμάκων (π.χ. συνολικά οργανοφωσφορικά και συνολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα), συνολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών. Εάν η ποιότητα του νερού έχει καταδειχθεί ότι είναι σταθερή για ένα τουλάχιστον χρόνο, οι προσδιορισμοί μπορούν να είναι λιγότερο συχνοί και κατά μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (π.χ. κάθε έξι μήνες).

Η φυσική περιεκτικότητα του νερού σε σωματίδια καθώς επίσης και σε συνολικό οργανικό άνθρακα (TOC) θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλότερη για να αποφεύγεται τυχόν προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην οργανική ύλη, πράγμα το οποίο μπορεί να μειώσει τη βιοδιαθεσιμότητά της (4). Η μέγιστη αποδεκτή τιμή είναι 5 mg/l όσον αφορά τη διαμερισμένη ύλη (ξηρά ουσία, μη διερχόμενη από φίλτρο 0,45 μm) και 2 mg/l όσον αφορά το συνολικό οργανικό άνθρακα (βλέπε παράρτημα 1). Αν είναι αναγκαίο, το νερό πρέπει να διηθείται πριν χρησιμοποιηθεί. Η συνεισφορά στη συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα στο νερό από τα ψάρια (απεκκρίσεις) και από τα υπολείμματα τροφών θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη. Καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα στο δοχείο δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κατά ποσότητα μεγαλύτερη των 10 mg/l (± 20 %) τη συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα που προέρχεται από την υπό δοκιμή ουσία και, εφόσον χρησιμοποιείται, από τον παράγοντα διαλυτοποίησης.

1.7.3. *Διαλύματα δοκιμής*

Παρασκευάζεται ένα αρχικό διάλυμα της προς δοκιμή ουσίας με κατάλληλη συγκέντρωση. Το αρχικό διάλυμα θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανάδευση της προς δοκιμή ουσίας στο νερό αραίωσης. Η χρήση διαλυτών ή μέσων διασποράς (διαλυτοποιητικών παραγόντων) καλό είναι να αποφεύγεται. Εντούτοις, μπορεί αυτό να χρειάζεται μερικές φορές για την παρασκευή αρχικού διαλύματος κατάλληλης συγκεντρώσεως. Οι διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη. ο μονομεθυλαιθέρας της αι3υλενογλυκόλης, ο διμεθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη. Μέσα διασποράς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το Cremophor RH40, το Tween 80, μεθυλοκυτταρίνη 0,01 % και το HCC-40. Όταν χρησιμοποιούνται ευκόλως βιοαποικοδομήσιμοι παράγοντες η χρήση τους θα πρέπει να γίνεται με προσοχή γιατί μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα με ανάπτυξη βακτηρίων στις δοκιμές διαρκούς ροής νερού. Η προς δοκιμή ουσία μπορεί να είναι ραδιοϊχνηθετημένη ενώ θα πρέπει να είναι του υψηλότερου δυνατού βαθμού καθαρότητας (π.χ. κατά προτίμηση > 98 %).

▼B

Στις δοκιμές διαρκούς ροής νερού, για την προσαγωγή των διαλυμάτων στους θαλάμους δοκιμής απαιτείται ένα σύστημα το οποίο να παρέχει συνεχώς και να αραιώνει ένα αρχικό διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας (π.χ. αντλία μετρήσεως, αναλογικός αραιωτής. σύστημα κορεσμού). Κατά προτίμηση, ο όγκος του νερού κάθε θαλάμου δοκιμής αντικαθίσταται πέντε τουλάχιστον φορές την ημέρα. Η διαδικασία διαρκούς ροής νερού προτιμάται, όταν όμως αυτό δεν είναι δυνατόν (π.χ. όταν οι προς δοκιμή οργανισμοί επηρεάζονται δυσμενώς) μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μία ημιστατική τεχνική υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας. Ο ρυθμός ροής των αρχικών διαλυμάτων και του νερού αραίωσης θα πρέπει να ελέγχεται 48 ώρες πριν και κατόπιν τουλάχιστον κάθε ημέρα κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Στον έλεγχο αυτό περιλαμβάνεται και ο προσδιορισμός του ρυθμού ροής διαμέσου κάθε θαλάμου δοκιμής, θα πρέπει δε να διασφαλίζεται να μην ποικίλλει σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20 % είτε εντός είτε μεταξύ των θαλάμων.

1.7.4. *Επιλογή τον είδους*

Σημαντικά κριτήρια για την επιλογή του είδους είναι το να βρίσκονται εύκολα, το να μπορούν να λαμβάνονται στα κατάλληλα μεγέθη και το να μπορούν να διατηρούνται ικανοποιητικά στο εργαστήριο. Άλλα κριτήρια για την επιλογή του είδους των ψαριών είναι η σπουδαιότητα τους από αναπαραγωγικής, εμπορικής και οικολογικής πλευράς καθώς επίσης και η συγκρίσιμη ευαισθησία, η παρελθούσα επιτυχής χρήση κ.λπ.

Διάφορα συνιστώμενα είδη περιλαμβάνονται στο παράρτημα 2. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, η διαδικασία όμως της δοκιμής μπορεί να πρέπει να προσαρμοστεί ώστε να επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να αναφέρεται η αιτιολογία της επιλογής του είδους και της πειραματικής μεθόδου.

1.7.5. *Διατήρηση των ψαριών*

Ο αρχικός πληθυσμός των ψαριών εγκλιματίζεται για δύο τουλάχιστον εβδομάδες σε νερό στη θερμοκρασία δοκιμής και κατά το διάστημα αυτό διατρέφεται επαρκώς και με τον ίδιο τύπο δίαιτας με εκείνον που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Έπειτα από ένα πρώτο χρονικό διάστημα 48 ωρών, καταγράφονται οι θνησιμότητες και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

— θνησιμότητα μεγαλύτερη του 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: στην περίπτωση αυτή απορρίπτεται όλη η παρτίδα

— θνησιμότητα μεταξύ 5 και 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: συνεχίζεται ο εγκλιματισμός για επτά ακόμη ημέρες

— θνησιμότητα μικρότερη του 5 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: η παρτίδα θεωρείται αποδεκτή εάν κατά τη διάρκεια των επόμενων επτά ημερών εμφανιστεί θνησιμότητα μεγαλύτερη του 5 % η όλη παρτίδα απορρίπτεται.

Πρέπει να διασφαλίζεται ότι τα ψάρια που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές είναι απαλλαγμένα από τυχόν εμφανείς ασθένειες ή ανωμαλίες. Αν υπάρχουν άρρωστα ψάρια, αυτά πρέπει να απορρίπτονται. Κατά τη διάρκεια των δύο εβδομάδων που προηγούνται της δοκιμής ή κατά τη διάρκεια της δοκιμής, δεν θα πρέπει να γίνεται καμιά θεραπευτική αγωγή των ψαριών για τυχόν ασθένεια.

▼B

1.8. ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.8.1. *Προκαταρκτική δοκιμή*

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της οριστικής δοκιμής, μπορεί να είναι χρήσιμο να γίνει ένα προκαταρκτικό πείραμα π.χ. επιλογή της ή των συγκεντρώσεων της προς δοκιμή ουσίας, διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής.

1.8.2. *Συνθήκες έκθεσης*

1.8.2.1. Διάρκεια της φάσης πρόσληψης

Μία πρόβλεψη της διάρκειας της φάσης πρόσληψης μπορεί να γίνει με βάση εμπειρίες που έχουν αποκτηθεί στην πράξη (π.χ. από μία προηγούμενη μελέτη ή κάποια χημική ουσία που σχετίζεται με τη συσσωρευόμενη) ή από ορισμένες εμπειρικές σχέσεις στις οποίες χρησιμοποιείται ή η γνωστή υδατοδιαλυτότητα ή ο γνωστός συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού της υπό δοκιμή ουσίας (βλέπε παράρτημα3).

Η φάση πρόσληψης θα πρέπει να διαρκεί 28 ημέρες εκτός κι αν αποδεδειγμένα επιτευχθεί νωρίτερα η ισορροπία. Εάν μέχρι την 28η ημέρα δεν έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση, η φάση πρόσληψης θα πρέπει να παρατείνεται, λαμβάνοντας και άλλες μετρήσεις, μέχρις ότου επιτευχθεί σταθερή κατάσταση ή για 60 ημέρες, όποιο συμβεί νωρίτερα από τα δύο.

1.8.2.2. Διάρκεια της φάσης αποβολής

Για να επιτευχθεί η ενδεδειγμένη (π.χ. 95 %) μείωση του Φορτίου της ουσίας στο σώμα (βλέπε παράρτημα 3 για εξήγηση της εκτίμησης) αρκεί συνήθως ένα χρονικό διάστημα ίσο με το μισό της διάρκειας της φάσης πρόσληψης. Εάν ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη αυτής της τιμής του 95 ίο είναι υπερβολικά μεγάλος, ξεπερνώντας π.χ. το διπλάσιο της κανονικής διάρκειας της φάσης πρόσληψης (δηλαδή περισσότερο από 56 ημέρες), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα μικρότερο χρονικό διάστημα (δηλαδή μέχρις ότου η τιμή της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας είναι μικρότερη του 10 % της τιμής στη σταθερή κατάσταση). Εντούτοις, για ουσίες που έχουν πολυπλοκότερα διαγράμματα πρόσληψης και αποβολής από εκείνα που αντιπροσωπεύονται από το μοντέλο του ενός διαμερίσματος, με κινητική πρώτης τάξεως, επιτρέπονται και μεγαλύτερης διάρκειας φάσεις αποβολής για τον προσδιορισμό των σταθερών ρυθμού απώλειας. Η περίοδος μπορεί, εντούτοις, να εξαρτάται από την περίοδο κατά την οποία η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια παραμένει πάνω από το αναλυτικό όριο ανίχνευσης.

1.8.2.3. Αριθμός των υπό δοκιμή ψαριών

0 αριθμός των ανά συγκέντρωση δοκιμής ψαριών επιλέγεται έτσι ώστε σε κάθε δειγματοληψία να υπάρχουν διαθέσιμα τουλάχιστον τέσσερα ψάρια ανά δείγμα. Εάν χρειάζεται μεγαλύτερη στατιστική αξιοπιστία, απαιτούνται περισσότερα ψάρια ανά δείγμα.

Εάν χρησιμοποιούνται ενήλικα ψάρια, πρέπει να αναφέρεται αν είναι αρσενικά ή θηλυκά ή αν στο πείραμα χρησιμοποιούνται και από τα δύο. Εάν χρησιμοποιούνται και από τα δύο φύλα, τότε, πριν από την έναρξη της έκθεσης, θα πρέπει να επιβεβαιώνεται ότι οι διαφορές στο λιπιδικό περιεχόμενο των δύο φύλων δεν είναι σημαντικές, αφού διαφορετικά μπορεί να χρειάζεται να συγκεντρωθούν ξεχωριστά όλα τα αρσενικά και όλα τα θηλυκά.

▼B

Για κάθε δοκιμή επιλέγονται ψάρια παρόμοιου βάρους έτσι ώστε τα μικρότερα να μην είναι ελαφρύτερα από τα δύο τρίτα του βάρους των μεγαλύτερων. Όλα τα ψάρια θα πρέπει να είναι της ίδιας τάξης ηλικίας και να προέρχονται από την ίδια πηγή. Επειδή το βάρος και η ηλικία των ψαριών φαίνεται να έχουν μερικές φορές σημαντική επίδραση στις τιμές του ΣΒΣ (1), τα στοιχεία αυτά καταγράφονται με ακρίβεια. Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα από το αρχικό απόθεμα των ψαριών για να γίνεται μία εκτίμηση του μέσου βάρους.

1.8.2.4. Πλήρωση

Για να ελαχιστοποιείται η μείωση της C_I που προκαλείται από την προσθήκη των ψαριών κατά την έναρξη της δοκιμής και να αποφεύγονται επίσης πτώσεις στη συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου, οι χρησιμοποιούμενες τιμές του λόγου νερού προς ψάρια είναι υψηλές. Σημαντικό ρόλο παίζει ο ρυθμός πλήρωσης να είναι κατάλληλος για το χρησιμοποιούμενο είδος ψαριού. Εν πάσει περιπτώσει, ο συνιστώμενος συνήθως ρυθμός πλήρωσης είναι 0,1-1,0 g ψαριών (υγρό βάρος) ανά λίτρο νερού ανά ημέρα. Υψηλοί ρυθμοί πλήρωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν εάν διαφαίνεται ότι η απαιτούμενη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας μπορεί να διατηρηθεί στα όρια του ± 20 % και ότι η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου δεν πέφτει κάτω από το 60 % του σημείου κορεσμού.

Για να επιλεγούν οι κατάλληλες διαδικασίες πλήρωσης, λαμβάνεται υπόψη το κατάλληλο περιβάλλον διαβίωσης του είδους. Για παράδειγμα, τα ψάρια που ζουν στο βυθό μπορεί να χρειάζονται μεγαλύτερο εμβαδόν πυθμένα του ενυδρείου για τον ίδιο όγκο νερού σε σχέση με τα ψάρια του πελάγους.

1.8.2.5. Διατροφή

Κατά τη διάρκεια των περιόδων εγκλιματισμού και δοκιμής, τα ψάρια διατρέφονται με κατάλληλη δίαιτα γνωστού λιπιδικού και συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου, σε ποσότητα ικανή ώστε να παραμένουν σε υγιή κατάσταση και να διατηρούν το σωματικό τους βάρος. Τα ψάρια διατρέφονται καθημερινά καθ' όλη τη διάρκεια των περιόδων εγκλιματισμού και δοκιμής σε επίπεδα περίπου 1 έως 2 % του σωματικού τους βάρους ανά ημέρα. Με τον τρόπο αυτό η λιπιδική συγκέντρωση στα περισσότερα είδη ψαριών διατηρείται σε ένα σχετικώς σταθερό επίπεδο κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Η ποσότητα της τροφής θα πρέπει να ξαναϋπολογίζεται, π.χ. μία φορά την εβδομάδα, για να διατηρείται με συνέπεια το σωματικό βάρος και το λιπιδικό περιεχόμενο. Για τον υπολογισμό αυτό. το βάρος των ψαριών σε κάθε θάλαμο δοκιμής μπορεί να εκτιμάται από το βάρος των προσφάτως δειγματισθέντων από το θάλαμο αυτό ψαριών. Τα ψάρια που παραμένουν στο θάλαμο δεν ζυγίζονται.

Τα αποφάγια και οι απεκκρίσεις απομακρύνονται καθημερινά από τους θαλάμους δοκιμής με σιφωνισμό λίγο μετά τη διατροφή (30 λεπτά έως 1 ώρα). Οι θάλαμοι διατηρούνται όσο το δυνατόν καθαρότεροι καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής έτσι ώστε η συγκέντρωση της οργανικής ύλης να διατηρείται όσο το δυνατόν χαμηλότερη, δεδομένου ότι η παρουσία οργανικού άνθρακα μπορεί να περιορίσει τη βιοδιαθεσιμότητα της υπό δοκιμή ουσίας (1).

Επειδή πολλές τροφές προέρχονται από ιχθυάλευρα, οι τροφές θα πρέπει να αναλύονται μήπως τυχόν υπάρχει σε αυτές η υπό δοκιμή ουσία. Επίσης, καλό είναι να γίνεται ανάλυση για τυχόν ύπαρξη γεωργικών φαρμάκων και βαρέων μετάλλων.

▼B

1.8.2.6. Φως και θερμοκρασία

Η φωτοπερίοδος είναι συνήθως 12 έως 16 ώρες ενώ η θερμοκρασία [± 2 °C)] θα πρέπει να είναι κατάλληλη για το είδος των ψαριών της δοκιμής (βλέπε παράρτημα 2). Ο τύπος και τα χαρακτηριστικά του φωτισμού θα πρέπει να είναι γνωστά. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται μήπως τυχόν η υπό δοκιμή ουσία φωτομετασχηματίζεται υπό τις συνθήκες φωτισμού της δοκιμής. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλος φωτισμός για να αποφεύγεται η έκθεση των ψαριών σε μη φυσικά φωτοπροϊόντα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί κάποιο φίλτρο για την απομάκρυνση UV ακτινοβολίας κάτω των 290 nm.

1.8.2.7. Συγκεντρώσεις της δοκιμής

Τα ψάρια εκτίθενται υπό συνθήκες διαρκούς ροής σε δύο τουλάχιστον συγκεντρώσεις της υπό δοκιμής ουσίας στο νερό. Κανονικά, η ανώτερη (ή ανώτατη) συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας επιλέγονται να είναι περίπου το 1 % της οξείας ασυμπτωτικής τιμής της LC_{50} και τουλάχιστον δέκα φορές υψηλότερη από το όριο ανίχνευσής της στο νερό με την χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο.

Η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής μπορεί επίσης να προσδιοριστεί διαιρώντας την οξεία 96h LC_{50} με μία κατάλληλη σχέση οξείας/χρονίας (οι κατάλληλοι λόγοι για ορισμένες χημικές ουσίες μπορεί να είναι περίπου 3 μέχρι 100). Εάν είναι δυνατόν, η ή οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις επιλέγονται έτσι ώστε να διαφέρουν από την παραπάνω κατά ένα συντελεστή δέκα. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν λόγω του κριτηρίου του 1 % της LC_{50} και του αναλυτικού ορίου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί συντελεστής κατώτερος του δέκα ή θα πρέπει να εξεταστεί η χρήση επισημασμένης με ^{14}C ουσίας δοκιμής. Καμία από τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις δεν θα πρέπει να είναι υψηλότερη από τη διαλυτότητα της υπό δοκιμή ουσίας.

Όταν χρησιμοποιείται κάποιος διαλυτοποιητικός παράγοντας, η συγκέντρωσή του δεν 3α πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,1 ml/l ενώ θα πρέπει να είναι η ίδια σε όλα τα δοχεία δοκιμής. Η συνεισφορά του, μαζί με την υπό δοκιμή ουσία, στη συνολική περιεκτικότητα του νερού δοκιμής σε οργανικό άνθρακα θα πρέπει να είναι γνωστή. Εντούτοις, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή χρήσης τέτοιων υλικών.

1.8.2.8. Μάρτυρες

Στη σειρά δοκιμών θα πρέπει να περιλαμβάνεται και ένας μάρτυρας νερού αραίωσης ή, εφόσον χρησιμοποιείται τέτοιος παράγοντας, ένας μάρτυρας με διαλυτοποιητικό παράγοντα, υπό την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι ο παράγοντας δεν έχει καμία επίδραση στα ψάρια. Εάν όχι, θα πρέπει να παρασκευάζονται και οι δύο μάρτυρες.

1.8.3. *Συχνότητα λήψης μετρήσεων της ποιότητας του νερού*

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, σε όλα τα δοχεία θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις της συγκέντρωσης του διαλελυμένου οξυγόνου, του TOC, του pH και της θερμοκρασίας. Στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο με την ανώτερη (ή ανώτατη) συγκέντρωση θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις της ολικής σκληρότητας και αλατότητας, εάν χρειάζεται. Το διαλελυμένο οξυγόνο και η αλατότητα, εφόσον χρειάζεται, θα πρέπει να μετρούνται τουλάχιστον τρεις φορές —στην αρχή, γύρω στο μέσον και στο τέλος της περιόδου πρόσληψης— και μία φορά την εβδομάδα κατά την περίοδο αποβολής. Ο TOC θα πρέπει να μετριέται στην αρχή της δοκιμής (24h και 48h πριν από την έναρξη της φάσης πρόσληψης) πριν από την προσθήκη των ψαριών και τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια τόσο της φάσης πρόσληψης όσο και της φάσης αποβολής. Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετριέται κάθε μέρα, το pH στην αρχή και στο τέλος κάθε περιόδου και η σκληρότητα μία φορά σε κάθε δοκιμή. Η θερμοκρασία θα πρέπει κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα τουλάχιστον δοχείο.

▼B

1.8.4. *Δειγματοληψία και ανάλυση ψαριών και νερού*

1.8.4.1. Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας ψαριών και νερού

Δείγματα νερού για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμής ουσίας λαμβάνονται πριν από την προσθήκη των ψαριών και κατά τη διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Τα δείγματα του νερού λαμβάνονται τουλάχιστον ταυτόχρονα με τα ψάρια και πριν από τη διατροφή. Κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας για να ελέγχονται αν είναι σύμφωνες με τα κριτήρια εγκυρότητας.

Δείγματα ψαριών λαμβάνοντας τουλάχιστον πέντε φορές κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης και τουλάχιστον τέσσερις φορές κατά τη διάρκεια της φάσης αποβολής. Επειδή ορισμένες φορές είναι δύσκολο να γίνει μία λογικά ακριβής εκτίμηση της τιμής του ΣΒΣ με βάση τον αριθμό αυτό δειγμάτων, ιδιαίτερα όταν η κινητική της αποβολής δεν είναι μία απλή κινητική πρώτης τάξεως, μπορεί να πρέπει να λαμβάνονται δείγματα με υψηλότερες συχνότητες και τις δύο περιόδους (βλέπε παράρτημα 4). Τα επιπλέον δείγματα αποθηκεύονται και αναλύονται μόνον αν τα αποτελέσματα του πρώτου γύρου αναλύσεων αποδειχθούν απρόσφορα για τον υπολογισμό του ΣΒΣ με την επιθυμητή ακρίβεια.

Ένα παράδειγμα αποδεκτού χρονοδιαγράμματος δειγματοληψίας δίδεται στο παράρτημα 4. Μπορούν το ίδιο εύκολα να καταρτιστούν και άλλα χρονοδιαγράμματα χρησιμοποιώντας άλλες καθ' υπόθεση τιμές P_{ow} για τον υπολογισμό του χρόνου έκθεσης για πρόσληψη ύψους 95 %.

Η δειγματοληψία συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης μέχρις ότου αποκατασταθεί σταθερή κατάσταση ή για 28 ημέρες, ανάλογα με το ποιο από τα δύο είναι νωρίτερα. Εάν μέσα σε 28 ημέρες δεν αποκατασταθεί σταθερή κατάσταση, η δειγματοληψία συνεχίζεται μέχρις ότου αποκατασταθεί σταθερή κατάσταση ή για 60 ημέρες, ανάλογα με το ποια περίπτωση φθάνει νωρίτερα. Πριν αρχίσει η φάση αποβολής τα ψάρια μεταφέρονται σε καθαρές δεξαμενές.

1.8.4.2. Δειγματοληψία και παρασκευή δείγματος

Δείγματα νερού για ανάλυση λαμβάνονται π.χ. δια σιφωνισμού μέσω αδρανών σωληνώσεων από ένα κεντρικό σημείο του θαλάμου δοκιμής. Επειδή ούτε η διήθηση ούτε η φυγοκέντρηση φαίνεται να διαχωρίζουν πάντοτε το μη βιοδιαθέσιμο κλάσμα της υπό δοκιμή ουσίας από εκείνο που είναι βιοδιαθέσιμο (ειδικά στην περίπτωση υπερλιπόφιλων χημικών ουσιών δηλαδή των ουσιών εκείνων με log P_{ou} > 5) (1)(5). τα δείγματα μπορούν να μην υποβάλλονται σε αυτές τις κατεργασίες.

Αντί αυτού, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε οι δεξαμενές να διατηρούνται όσο το δυνατόν καθαρότερες ενώ κατά τη διάρκεια τόσο της φάσης πρόσληψης όσο και της φάσης αποβολής θα πρέπει να παρακολουθείται η περιεκτικότητα σε συνολικό οργανικό άνθρακα.

Σε κάθε δειγματοληψία, από τους θαλάμους δοκιμής λαμβάνεται κατάλληλος αριθμός ψαριών (κανονικά τουλάχιστον τέσσερα). Τα δειγματοληπτούμενα ψάρια πλένονται γρήγορα με νερό, στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί, θανατώνονται ακαριαία με τον προσφορότερο και ανθρωπιστικότερο τρόπο και κατόπιν ζυγίζονται.

Προτιμότερο είναι η ανάλυση των ψαριών και του νερού να γίνεται αμέσως μετά τη δειγματοληψία για να εμποδίζεται τυχόν αποικοδόμηση ή άλλες απώλειες και να υπολογίζονται κατά προσέγγιση ρυθμοί πρόσληψης και αποβολής καθώς προχωρεί η δοκιμή. Με την άμεση ανάλυση αποφεύγονται επίσης καθυστερήσεις στον προσδιορισμό όταν έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση.

▼B

Αν δεν μπορεί να γίνει αμέσως η ανάλυση, τα δείγματα αποθηκεύονται με μία κατάλληλη μέθοδο. Πριν αρχίσει η μελέτη, λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την καταλληλότερη μέθοδο αποθήκευσης για τη συγκεκριμένη ουσία — π.χ. βαθεία κατάψυξη, διατήρηση στους 4 °C, διάρκεια της αποθήκευσης, εκχύλιση κ.λπ.

1.8.4.3. Ποιότητα της αναλυτικής μεθόδου

Επειδή η όλη διαδικασία εξαρτάται βασικά από την ορθότητα, την ακρίβεια και την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιείται για την υπό δοκιμή ουσία, ελέγχεται πειραματικά αν η ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα της ανάλυσης της ουσίας, καθώς επίσης και η ανάκτηση της υπό δοκιμή ουσίας, από το νερό και τα ψάρια είναι ικανοποιητικές για τη συγκεκριμένη μέθοδο. Ελέγχεται επίσης μήπως τυχόν στο χρησιμοποιούμενο νερό αραιώσεως υπάρχει ανιχνεύσιμη ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας.

Εφόσον χρειάζεται, οι ευρισκόμενες από τη δοκιμή τιμές των C_w και C_f διορθώνονται για να ληφθούν υπόψη οι τιμές ανάκτησης και οι τιμές προϋπαρχουσών συγκεντρώσεων στους μάρτυρες. Ο χειρισμός των δειγμάτων του νερού και των ψαριών γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι κίνδυνοι μόλυνσης και απωλειών (που προέρχονται π.χ. από προσρόφηση από τον εξοπλισμό δειγματοληψίας).

1.8.4.4. Ανάλυση του δείγματος ψαριών

Εάν στη δοκιμή χρησιμοποιούνται ραδιοϊχνηθετημένα υλικά, μπορεί ή να προσδιοριστεί το σύνολο του ραδιοϊχνηθέτη (δηλαδή μητρική ουσία και μεταβολίτες) ή τα δείγματα να καθαριστούν έτσι ώστε να μπορεί να αναλυθεί μόνον η μητρική ουσία. Επίσης, οι βασικοί μεταβολίτες μπορούν να χαρακτηριστούν ή σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης, όποιο έλθει νωρίτερα. Εάν ο ΣΒΣ ως προς τα συνολικά ραδιοϊχνηθετημένα υπολείμματα είναι > 1 000 %, μπορεί να είναι προτιμότερο, σε ορισμένες δε κατηγορίες χημικών ουσιών όπως γεωργικά φάρμακα συνιστάται ιδιαίτερα, να ταυτοποιούνται και να προσδιορίζονται ποσοτικά τα προϊόντα αποικοδόμησης που αντιπροσωπεύουν ποσοστό > 10 % των συνολικών υπολειμμάτων στους ιστούς των ψαριών σε σταθερή κατάσταση. Εάν τακτοποιηθούν και προσδιοριστούν ποσοτικώς προϊόντα αποικοδόμησης που αντιπροσωπεύουν ποσοστό > 10 % των συνολικών ραδιοϊχνηθετημένων υπολειμμάτων στους ιστούς των ψαριών, συνιστάται επίσης να ταυτοποιούνται και να προσδιορίζονται ποσοτικά και τα προϊόντα αποικοδόμησης στο νερό δοκιμής.

Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας πρέπει συνήθως να προσδιορίζεται σε κάθε ζυγισμένο επιμέρους ψάρι. Εάν κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατόν, μπορεί να γίνεται συγκέντρωση των δειγμάτων σε κάθε δειγματοληψία αλλά η συγκέντρωση περιορίζει τις στατιστικές διαδικασίες που μπορούν να εφαρμοστούν στα δεδομένα. Εάν παίζει σημαντικό ρόλο το να εφαρμοστεί κάποια συγκεκριμένη στατιστική διαδικασία και αξιοπιστία, τότε στη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο κατάλληλος αριθμός ψαριών που συμβαδίζει με την επιθυμητή διαδικασία συγκέντρωσης και αξιοπιστία (6) (7).

Ο ΣΒΣ θα πρέπει να εκφράζει ως συνάρτηση του συνολικού υγρού βάρους και, στην περίπτωση λίαν λιπόφιλων ουσιών, ως συνάρτηση του λιπιδικού περιεχομένου. Εφόσον είναι δυνατόν, το λιπιδικό περιεχόμενο των ψαριών προσδιορίζεται σε κάθε δειγματοληψία. Για τον προσδιορισμό του λιπιδικού περιεχομένου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι (παραπομπές 8 και 2 του παραρτήματος 3). Ως πρότυπη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της εκχύλισης με χλωροφόρμιο/μεθανόλη (9). Οι διάφορες υπάρχουσες μέθοδοι δεν δίδουν ταυτόσημα αποτελέσματα (10). επομένως παίζει σημαντικό ρόλο το να δίδονται στοιχεία για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Εφόσον είναι δυνατόν, η ανάλυση για τα λιπίδια θα πρέπει να γίνεται στο ίδιο εκχύλισμα με εκείνο που προορίζεται για ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας, επειδή τα λιπίδια πρέπει συχνά να απομακρύνονται από το εκχύλισμα πριν αυτό υποβληθεί σε χρωματογραφική ανάλυση. Το λιπιδικό περιεχόμενο των ψαριών (ως mg/kg υγρού βάρους) στο τέλος του πειράματος δεν θα πρέπει να διαφέρει από εκείνο της αρχής περισσότερο από ± 25 %. Θα πρέπει επίσης να αναφέρεται και η % περιεκτικότητα των ιστών σε στερεά ώστε να μπορεί να γίνεται μετατροπή της λιπιδικής συγκέντρωσης από ξηρά σε υγρή βάση.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η καμπύλη πρόσληψης της υπό δοκιμή ουσίας λαμβάνεται με γραφική παράσταση της συγκέντρωσής της στα/επί των ψαριών (ή των συγκεκριμένων ιστών) στη φάση πρόσληψης συναρτήσει του χρόνου σε αριθμητικές κλίμακες. Εάν η καμπύλη έχει φθάσει σε «πλατώ», αν δηλαδή παρουσιάζει ασυμπτωτική σχεδόν πορεία σε σχέση με. τον άξονα του χρόνου, ο $ΣΒΣ_{σκ}$ υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\frac{C_f \text{ σε σταθερή κατάσταση (μέση)}}{C_w \text{ σε σταθερή κατάσταση (μέση)}}$$

Εάν δεν επιτευχθεί σταθερή κατάσταση, ενδέχεται να μπορεί να υπολογιστεί ένας $ΣΒΣ_{σκ}$ επαρκούς ακρίβειας από πλευράς εκτίμησης κινδύνων από μία «σταθερή κατάσταση» στο 80 % ($1{,}6/k_2$) ή 95 % ($3{,}0/k_2$) της ισορροπίας.

Προσδιορίζεται επίσης και ο συντελεστής συγκέντρωσης ($ΣΒΣ_k$), ως ο λόγος k_1/k_2, των δύο σταθερών κινητής πρώτης τάξεως. Η σταθερά ρυθμού αποβολής (k_2) προσδιορίζεται συνήθως από την καμπύλη αποβολής (δηλαδή τη γραφική παράσταση της μείωσης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια συναρτήσει του χρόνου). Κατόπιν υπολογίζεται η σταθερά ρυθμού πρόσληψης (k_1) με βάση την k_2 και μία τιμή C_f που προέρχεται από την καμπύλη πρόσληψης (βλέπε, επίσης παράρτημα 5). Η μέθοδος που προτιμάται για τη λήψη του $ΣΒΣ_κ$ και των σταθερών k_1 και k_2, είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (11). Διαφορετικά, για τον υπολογισμό των k_1 και k_2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν γραφικές μέθοδοι. Εάν η καμπύλη αποβολής είναι φανερό ότι δεν ανήκει στις καμπύλες πρώτης τάξεως, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πολυπλοκότερα μοντέλα (παράγραφος παραρτήματος 3) και να ζητούνται οδηγίες από έναν βιοστατιστικολόγο.

2.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή αν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου.

Εάν οι καμπύλες πρόσληψης και αποβολής είναι σαφώς οριοθετημένες. αυτό αποτελεί ένδειξη δεδομένων βιοσυγκέντρωσης καλής ποιότητας. Η διαφορά στις σταθερές πρόσληψης/αποβολής μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων της δοκιμής θα πρέπει να είναι λιγότερο του 20 %. Εάν παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές στους ρυθμούς πρόσληψης/αποβολής μεταξύ των δύο χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων δοκιμής, αυτές θα πρέπει να καταγράφονται και να δίδονται πιθανές εξηγήσεις. Γενικά, το όριο εμπιστοσύνης των ΣΒΣ που λαμβάνονται από καλοσχεδιασμένες μελέτες πλησιάζει το ± 20 %.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

3.1. ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

— φυσική μορφή και, όπου απαιτείται, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης (στα οποία συμπεριλαμβάνεται και η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, αν χρειάζεται)

— εφόσον έχει πραγματοποιηθεί ραδιοϊχνηθέτηση, η ακριβής θέση του ή των επισημασμένων ατόμων και το ποσοστό ραδιενέργειας που οφείλεται σε προσμείξεις.

▼B

3.2 ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΕΙΔΟΣ

— επιστημονική ονομασία, στέλεχος, πηγή. τυχόν προηγηθείσα αγωγή, εγκλιματισμός, ηλικία, κλίμακα μεγεθών κ.λπ.

3.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

— χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (ροής νερού ή ημιστατική)

— τύπος και χαρακτηριστικά του χρησιμοποιηθέντος φωτισμού και φωτοπερίοδος(-οι)

— σχέδιο δοκιμής (π.χ. αριθμός και μέγεθος θαλάμων δοκιμής, ρυθμός αντικατάστασης νερού, αριθμός ταυτόσημων επαναλήψεων, αριθμός ψαριών ανά ταυτόσημη επανάληψη, αριθμός συγκεντρώσεων δοκιμής, διάρκεια των οάσεων πρόσληψης και αποβολής, συχνότητα δειγματοληψίας για τη λήψη δειγμάτων ψαριών και νερού)

— μέθοδος παρασκευής αρχικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (εφόσον χρησιμοποιείται, πρέπει να αναφέρεται ο διαλυτοποιητικός παράγοντας, η συγκέντρωσή του και η συνεισφορά του στη συγκέντρωση οργανικού άνθρακα στο νερό δοκιμής)

— οι ονομαστικές συγκεντρώσεις των δοκιμών, οι μέσες τιμές των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοχεία δοκιμής και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν

— πηγή του νερού αραίωσης, περιγραφή τυχόν προηγηθείσας επεξεργασίας, αποτελέσματα οποιασδήποτε αποδεικτικής διαδικασίας για την ικανότητα των υπό δοκιμή ψαριών να ζουν στο νερό και χαρακτηριστικά του νερού ήτοι pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετράται), συνολικός οργανικός άνθρακας, αιωρούμενα στερεά, αλατότητα του μέσου δοκιμής (εφόσον χρειάζεται) και οποιεσδήποτε άλλες πραγματοποιηθείσες μετρήσεις

— ποιότητα του νερού στα δοχεία δοκιμής, pH, σκληρότητα, TOC, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου

— λεπτομερείς πληροφορίες για τη διατροφή (π.χ. τύπος τροφής, πηγή, σύσταση — τουλάχιστον λιπιδικό και πρωτεϊνικό περιεχόμενο εάν είναι δυνατόν, δοθείσες ποσότητες και συχνότητα)

— στοιχεία για την κατεργασία των δειγμάτων ψαριών και νερού, συμπεριλαμβανομένων και στοιχείων παρασκευής, αποθήκευσης, διαδικασιών εκχύλισης και αναλύσεως (και ακρίβεια) για την υπό δοκιμή ουσία και το λιπιδικό περιεχόμενο (εφόσον μετριέται).

3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

— αποτελέσματα από τυχόν πραγματοποιηθείσα προκαταρκτική μελέτη

— θνησιμότητα των μαρτύρων και των υπό δοκιμή ψαριών σε κάθε θάλαμο έκθεσης και τυχόν παρατηρηθείσα ανώμαλη συμπεριφορά

— το λιπιδικό περιεχόμενο των ψαριών (εάν έγινε προσδιορισμός κατά τη δοκιμή)

— καμπύλες (συμπεριλαμβανομένων και όλων των μετρηθέντων δεδομένων) από τις οποίες φαίνεται η πρόσληψη και αποβολή της χημικής ουσίας στα ψάρια κατά το χρονικό διάστημα μέχρι τη σταθερή κατάσταση

▼B

— οι C_f και C_w (με τυπική απόκλιση και εύρος, αν απαιτείται) για όλες τις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας [(με τη C_f εκφραζόμενη σε μg/g υγρού βάρους (ppm) του συνόλου του σώματος ή συγκεκριμένων ιστών του, π.χ. λιπίδια, και τη C_w σε μg/ml (ppm)]. καθώς και οι τιμές C_w για τη σειρά των μαρτύρων (θα πρέπει να αναφέρεται και η προϋπάρχουσα)

— ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης σταθερής κατάστασης ($ΣΒΣ_{δκ}$) ή/και ο συντελεστής κινητικής συγκέντρωσης ($ΣΒΣ_k$) και, εφόσον γίνεται, 95 % όρια για τις σταθερές ρυθμού πρόσληψης και αποβολής (εκφραζόμενες όλες σε σχέση με το σύνολο του σώματος και το συνολικό λιπιδικό περιεχόμενο, εφόσον μετριέται, των ζώων ή συγκεκριμένων ιστών τους), όρια εμπιστοσύνης και τυπική απόκλιση (εφόσον υπάρχουν) και μέθοδοι υπολογισμού/ανάλυσης δεδομένων για κάθε χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας

— όπου χρησιμοποιούνται ραδιοϊχνηθετημένες ουσίες και, εφόσον απαιτείται, η συσσώρευση τυχόν ανιχνευόμενων μεταλλευμάτων

— οτιδήποτε ασύνηθες γύρω από τη δοκιμή, οποιαδήποτε απόκλιση από τις διαδικασίες αυτές και οποιεσδήποτε άλλες σχετικές πληροφορίες.

Η λήψη αποτελεσμάτων με τον χαρακτηρισμό «μη ανιχνευόμενο στο όριο ανιχνεύσεως» θα πρέπει να αποφεύγεται όσο είναι δυνατόν με την εφαρμογή μεθόδου προδοκιμής και με κατάλληλο πειραματικό σχεδιασμό, επειδή τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό σταθερών ρυθμού.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) Connell D.W. (1988). Bioaccumuladon behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, σ. 117-156.

(2) Bintein S.. Devillers. J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research. 1, 29-390.

(3) OECD. Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No 3.

(4) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute. Δανία.

(5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. Ιούλιος 1994.

(6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1. 5600 Fisher's Lane Rockville, MD 20852, Ιούλιος 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(l). Analysis of Human Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Evironmental Samples. Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) in «The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation», Ch. 2.3, Part II. Κρατικός Οργανισμός Εκδόσεων, Χάγη, Ολλανδία.

▼B

(9) Gardner et al., (1995). Limn. & Oceanogr. 30, 1099-1105.

(10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation, Envir. Toxicol. Chem. 10, σ. 1431-1436.

(11) ΕΕΚ, Βιοσυγκέντρωση χημικών ουσιών στα ψάρια: Μέθοδος flow-through — Πρόγραμμα διεργαστηριακών δοκιμών, 1984-1985. Τελική έκθεση Μάρτιος 1987. Συγγραφείς: P. Kristensen και N. Nyholm.

(12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988). Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fisches and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

Παραρτημα 1

Χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραιώσεως

	Ουσία	Οριακή συγκέντρωση
1	Σωματίδια	5 mg/l
2	Ολικός οργανικός άνθρακας	2 mg/l
3	Μη ιονισμένη αμμωνία	1 μg/l
4	Υπολείμματα χλωρίου	10 μg/l
5	Σύνολο οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	50 ng/l
6	Σύνολο οργανοχλωριούχων γεωργικών φαρμάκων μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	50 ng/l
7	Ολικό οργανικό χλώριο	25 ng/l
8	Αργίλιο	1 μg/l
9	Αρσενικό	1 μg/l
10	Χρώμιο	1 μg/l
11	Κοβάλτιο	1 μg/l
12	Χαλκός	1 μg/l
13	Σίδηρος	1 μg/l
14	Μόλυβδος	1 μg/l
15	Νικέλιο	1 μg/l
16	Ψευδάργυρος	1 μg/l
17	Κάδμιο	100 ng/l
18	Υδράργυρος	100 ng/l
19	Άργυρος	100 ng/l

▼B

Παράρτημα 2

Συνιστώμενα για τις δοκιμές είδη ψαριών

	Συνιστώμενα είδη	Συνιστώμενη περιοχή θερμοκρασίας δοκιμής (°C)	Συνιστώμενο ολικό μήκος ψαριών δοκιμής (cm)
1	Danio rerio ([1]) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Ζέμπρα	20-25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Λιποκέφαλος φοξίνος	20-25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Κυπρίνος ή γριβάδι	20-25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Termminck and Schlegel) Ρυζόψαρο	20-25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Γκάπυ	20-25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Γαλαζολιόψαρο	20-25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Ιριδίζουσα πέστροφα	13-17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Τριάκανθος γαστερόστεος ή αγκαθερό	18-20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B, Τόμ. 252, σ. 231.

Σε πολλές χώρες χρησιμοποιούνται διάφορα θαλασσινά είδη ή είδη διαβιούντα στις εκβολές ποταμών, π.χ.:

Κηλιδόψαρο (λειόστομος)	*Leiostomus xanthurus*
Προβατοκέφαλος	*Cyprinodon variegatus*
Πλευρασημόψαρο	*Menidia beryllina*
Πέρκα	*Cymatogaster aggregate*
Αγγλική γλώσσα	*Parophrys vertulus*
Ελαφόκερος καλλιώνυμος	*Leptocottus armatus*
Τριάκανθος γαστερόστεος	*Gasteroteus aculeatus*
Λαυράκι	*Dicentracus labrax*
Σίρκο	*Alburnus alburnus*

Συλλογή

Τα ψάρια των γλυκών νερών που παρατίθενται στον παραπάνω πίνακα είναι εύκολο να εκτραφούν ή/και βρίσκονται εύκολα καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου, ενώ τα θαλασσινά είδη και τα είδη που διαβιούν στις εκβολές ποταμών περιορίζονται εν μέρει στις αντίστοιχες χώρες. Μπορούν να εκτραφούν και να καλλιεργηθούν είτε σε ιχθυοτροφεία είτε στο εργαστήριο, υπό ελεγχόμενες από πλευράς ασθενειών και παρασίτων συνθήκες, έτσι ώστε τα προ δοκιμή ζώα να είναι υγιή και γνωστής καταγωγής. Τα ψάρια αυτά μπορούν να βρεθούν σε πολλά μέρη του κόσμου.

▼B

Παραρτημα 3

Πρόβλεψη της διάρκειας των φάσεων πρόσληψης και αποβολής

1. *Πρόβλεψη της διάρκειας της φάσης πρόσληψης*

Πριν από την πραγματοποίηση της δοκιμής, μπορεί να γίνει μία εκτίμηση της k_2 και συνεπώς κάποιου ποσοστού του χρόνου που απαιτείται για την επίτευξη σταθερής κατάστασης από εμπειρικές σχέσεις μεταξύ της k_2 και του συντελεστή κατανομής η-οκτανόλης/νερού (P_{ow}) ή της k, και της υδατοδιαλυτότητας (s).

Μία εκτίμηση της k_2 (ημέρα^{-1}) μπορεί να γίνει π.χ. από την ακόλουθη εμπειρική σχέση (1):

$$\log_{10}k_2 = - 0{,}414 \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47 \quad (r^2 = 0{,}95) \qquad \text{(εξίσωση 1)}$$

Για άλλες σχέσεις βλέπε παραπομπή (2).

Εάν ο συντελεστής κατανομής (P_{ow}) δεν είναι γνωστός, μία εκτίμησή του μπορεί να γίνει (3) αν ξέρουμε την υδατοδιαλυτότητα (s) της ουσίας μέσω της σχέσης

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0{,}862 \log_{10}(s) + 0{,}710 \quad (r^2 = 0{,}994) \qquad \text{(εξίσωση 2)}$$

όπου

s = διαλυτότητα (moles/l): (n = 36)

Οι σχέσεις αυτές εφαρμόζονται μόνον σε ουσίες με τιμές log P_{ow} μεταξύ 2 και 6,5 (4).

Ο χρόνος για να φθάσουμε σε κάποιο ποσοστό σταθερής κατάστασης μπορεί να υπολογιστεί, χρησιμοποιώντας την εξ εκτιμήσεως τιμή της k_2 από τη γενική κινητική εξίσωση που περιγράφει την πρόσληψη και αποβολή (κινητική πρώτης τάξεως):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

ή εάν η C_w είναι σταθερά:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \, (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{(εξίσωση 3)}$$

Όταν έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση ($t \rightarrow \infty$). η εξίσωση 3 μπορεί να γίνει (5)(6):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2}.C_w \text{ ή } C_f/C_w = k_1/k_2 = \Sigma B\Sigma$$

Τότε η k_1/k_2 . Cw είναι μία προσέγγιση στο ψάρι σε «σταθερή κατάσταση» (C_{fs}).

Η εξίσωση 3 μπορεί να γραφεί ως:

$$C_f = C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t}) \text{ ή } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{(εξίσωση 4)}$$

Εφαρμόζοντας την εξίσωση 4, μπορεί να προβλεφθεί ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη κάποιου ποσοστού σταθερής κατάστασης όταν έχει προεκτιμηθεί η k_2 με την εξίσωση 1 ή 2.

▼B

Κατά κανόνα, η στατιστικώς άριστη διάρκεια της φάσης πρόσληψης για τη λήψη στατιστικώς αποδεκτών δεδομένων (ΣBK_k) είναι το διάστημα εκείνο που απαιτείται ώστε η καμπύλη του λογαρίθμου της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα ψάρια που χαράσσεται συναρτήσει του χρόνου να φθάσει στο μέσο της. ή $1,6/k_2$ ή το 80 % της σταθερής κατάστασης αλλά όχι περισσότερο από 3,0/k ή το 95 % της σταθερής κατάστασης (7).

Ο χρόνος που απαιτείται για να φθάσουμε στο 80 % ο της σταθερής κατάστασης είναι (εξίσωση 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ ή } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{(εξίσωση 5)}$$

Ομοίως, η αντίστοιχη εξίσωση για το 95 % της σταθερής κατάστασης είναι:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{(εξίσωση 6)}$$

Για παράδειγμα, η διάρκεια της φάσης πρόσληψης για μία υπό δοκιμή ουσία με log P_{ow} = 4 θα είναι (εφαρμόζοντας τις εξισώσεις 1, 5, 6):

$\log_{10}k_2$ = - 0,414.(4) + 1,47 $\qquad$ k_2 = 0,652 ημέρες^{-1}

πρόσληψη (80 %) = 1,6/0,652, δηλαδή 2,45 ημέρες (59 ώρες)

ή πρόσληψη (95 %) = 3,0/0,652, δηλαδή 4,60 ημέρες (110 ώρες).

Ομοίως για μία υπό δοκιμή ουσία με s = 10^{-5} Mol/l [log(s) = - 5,0]. η διάρκεια της πρόσληψης θα είναι (εφαρμόζοντας τις εξισώσεις 1, 2, 5, 6):

$\log_{10}$ (P_{ow}) = 0,862 (- 5,0) + 0,710 = 5,02

$\log_{10}$ K_2 = 0,414 (5,02) + 1,47

k_2 = 0,246 ημέρες $^{-1}$

πρόσληψη (80 %) = 1,6/0,246, δηλαδή 6,5 ημέρες (156 ώρες)

ή πρόσληψη (95 %) = 3,0/0,246, δηλαδή 12,2 ημέρες (293 ώρες)

Εναλλακτικός, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η έκφραση:

t_{eq} = 6,54 × 10^3 P_{ow} + 55,31 (ώρες)

για τον υπολογισμό του χρόνου που απαιτείται για την επίτευξη ικανής σταθερής κατάστασης (4).

2. *Πρόβλεψη της διάρκειας της φάσης αποβολής*

Μία πρόβλεψη του χρόνου που απαιτείται για να μειωθεί το σωματικό φορτίο σε ένα ορισμένο ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης μπορεί επίσης να ληφθεί και από την γενική εξίσωση που περιγράφει την πρόσληψη και την αποβολή (κινητική πρώτης τάξεως)(1)(8).

Για τη φάση αποβολής, η Cw υποτίθεται ότι είναι μηδέν. Η εξίσωση μπορεί να αναχθεί σε:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \text{ ή } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

όπου $C_{f,o}$ είναι η συγκέντρωση στην αρχή της περιόδου αποβολής. Ποσοστό 50 % αποβολής επιτυγχάνεται κατά τη χρονική στιγμή t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ ή } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Ομοίως, ποσοστό αποβολής 95 % επιτυγχάνεται κατά τη χρονική στιγμή:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Εάν για την πρώτη περίοδο εφαρμόζεται 80 % πρόσληψη ($1,6/k_2$) και 95 % απώλεια κατά τη φάση αποβολής ($3,0/k_2$) τότε η φάση αποβολής είναι περίπου διπλάσια της διάρκειας της φάσης πρόσληψης.

Αξίζει να σημειωθεί εντούτοις ότι οι εκτιμήσεις βασίζονται στην υπόθεση ότι οι φάσεις πρόσληψης και αποβολής ακολουθούν κινητική πρώτης τάξεως. Εάν είναι προφανές ότι δεν ακολουθείται κινητική πρώτης τάξεως, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πολυπλοκότερα μοντέλα [π.χ. παραπομπή (1)].

Βιβλιογραφία (παραρτήματος 3)

(1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol, and Chem. 1. σ. 309-320.

(2) Kristensen P. (1991). Bioconcentration is fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (19S2). Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ: Sci. Technol. 16 (I), σ. 4-10.

(4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), σ. 701-707.

(5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neeiy W.B. (1975). Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), σ. 785-792.

(6) Ernst W. (1985). Accumulation in aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environ-mental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P.. Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4, σ. 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

(7) Reilly P.M., Bajramovc R.. Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977). Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kenetic models, Can. J. Chem. Eng *55,* σ. 614-622.

(8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, σ. 3-19.

▼B

Παραρτημα 4

Θεωρητικό παράδειγμα διαγράμματος δειγματοληψίας για δοκιμές βιοσυγκέντρωσης ουσιών P_{ow} = 4

Δειγματοληψία ψαριών	Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψιών		Αριθμός δειγμάτων νερού	Αριθμός ψαριών ανά δείγμα
	Ελάχιστη απαιτούμενη συχνότητα (ημέρες)	Πρόσθετη δειγματοληψία		
Φάση πρόσληψης	- 1 0		2 (*) 2	Προσθήκη 45-80 ψαριών
1η	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2η	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3η	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4η	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5η	4,7		2	6
Φάση αποβολής				Μεταφορά ψαριών σε νερό χωρίς υπό δοκιμή ουσία
6η	5,0	5,3		4 (4)
7η	5,9	7,0		4 (4)
8η	9,3	11,2		4 (4)
9η	14,0	17,5		6 (4)

(*) Δειγματοληψία έπειτα από παροχή νερού όγκου τουλάχιστον τριών θαλάμων

Οι τιμές σε παρενθέσεις είναι αριθμοί δειγμάτων (νερού, ψαριών) που πρέπει να λαμβάνονται εάν διενεργείται πρόσθετη δειγματοληψία

Σημείωση: Η προεκτίμηση της k_2 για log P_{ow}4,0 είναι 0,652 ημέρες $^{-1}$. Η συνολική διάρκεια του πειράματος ορίζεται σε 3 × πρόσληψη = 3 × 4,6 ημέρες δηλαδή 14 ημέρες. Για την εκτίμηση της πρόσληψης βλέπε παράρτημα 3.

▼B

Παραρτημα 5

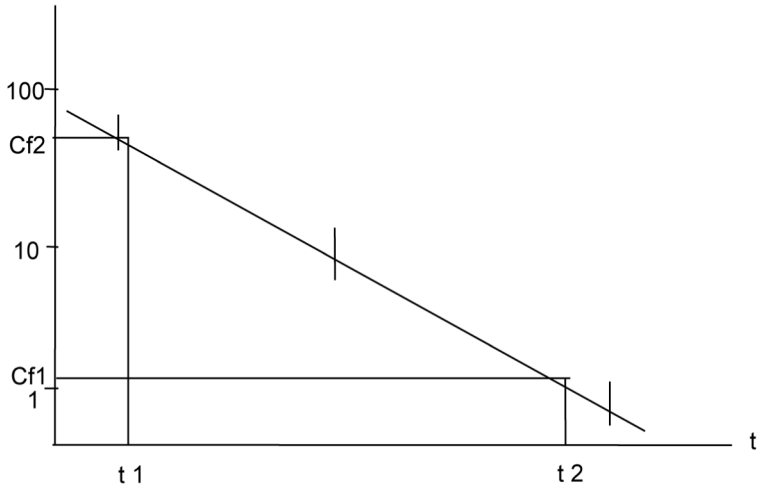
Διάκριση μοντέλων

Τα περισσότερα από τα δεδομένα βιοσυγκέντρωσης υποτίθεται ότι περιγράφονται «λογικά» καλά από ένα απλό μοντέλο δύο διαμερισμάτων/δύο παραμέτρων, όπως φαίνεται από την ευθύγραμμη καμπύλη που προσεγγίζει τα σημεία των συγκεντρώσεων στα ψάρια, κατά τη διάρκεια της φάσης αποβολής, όταν αυτά σημειώνονται σε ημιλογαριθμικό χάρτη. (Όπου τα σημεία αυτά δεν μπορούν να περιγράφουν από ευθύγραμμη καμπύλη τότε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο πολύπλοκα μοντέλα, βλέπε π.χ. Spacie and Hamelink (παραπομπή 1 του παραρτήματος 3).

Γραφική μέθοδος για τον προσδιορισμό της σταθεράς ρυθμού αποβολής (απώλειας) k_2

Σε ημιλογαριθμικό χάρτη σχεδιάζεται η γραφική παράσταση των τιμών των συγκεντρώσεων της ευρεθείσας υπό δοκιμή ουσίας σε κάθε δείγμα ψαριών συναρτήσει του χρόνου δειγματοληψίας. Η κλίση της γραμμής αυτής είναι k_2.

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Σημειώστε ότι αν τυχόν η καμπύλη αποκλίνει από τη μορφή ευθείας γραμμής αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η φάση της αποβολής ακολουθεί πολυπλοκότερη κινητική από εκείνη της πρώτης τάξεως. Για τη μελέτη κινητικών αποβολής που αποκλίνουν από την κινητική πρώτης τάξεως μπορεί να εφαρμοστεί κάποια γραφική μέθοδος.

Γραφική μέθοδος για τον προσδιορισμό της σταθεράς ρυθμού πρόσληψης k_1

Εφόσον είναι γνωστή η k_2. η k_1. υπολογίζεται ως εξής:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{(εξίσωση 1)}$$

Η τιμή της C_3 βρίσκεται από το μέσον της ομαλής καμπύλης πρόσληψης που κατασκευάζεται από τα δεδομένα όταν χαράσσεται η λογαριθμική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου (σε αριθμητική κλίμακα).

▼B

Μέθοδος με χρήση Η.Υ. για τον υπολογισμό των σταθερών ρυθμού πρόσληψης και αποβολής (απώλειας)

Η προτιμώμενη μέθοδος για την εύρεση του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης και των σταθερών ρυθμού k_1 και k_2 είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Με τα προγράμματα αυτά βρίσκονται οι τιμές των k_1 και k_2 εφόσον υπάρχει μία σειρά διαδοχικών χρονικών δεδομένων συγκεντρώσεως και το μοντέλο:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{(εζίσωση 2)}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > t_c \qquad \text{(εζίσωση 3)}$$

όπου t_c= ο χρόνος στο τέλος της φάσης πρόσληψης.

Η προσέγγιση αυτή παρέχει κατ' εκτίμηση τιμές τυπικής απόκλισης των k_1 και k_2

Δεδομένου ότι στις περισσότερες περιπτώσεις το k_2 μπορεί να εκτιμηθεί από την καμπύλη αποβολής με σχετικώς υψηλή ακρίβεια, και επειδή λόγω του ισχυρού συσχετισμού που υπάρχει μεταξύ των δύο παραμέτρων τα k_1 και k_2 αν εκτιμώνται ταυτόχρονα, μπορεί να είναι προτιμότερο να υπολογιστεί πρώτα η k_2 μόνο από τα δεδομένα αποβολής και στη συνέχεια να υπολογιστεί η k_1 από τα δεδομένα πρόσληψης χρησιμοποιώντας μη γραμμική αναγωγή.

▼B

Γ.14. ΔΟΚΙΜΗ ΝΕΑΝΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΨΑΡΙΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η δοκιμή αυτή τοξικότητας κατά την ανάπτυξη αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 215 (2000).

1.1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα δοκιμή αποσκοπεί στην εκτίμηση των επιπτώσεων της παρατεταμένης έκθεσης σε χημικές ουσίες επί της ανάπτυξης νεαρών ψαριών. Βασίζεται σε μέθοδο, η οποία αναπτύχθηκε και δοκιμάστηκε διεργαστηριακά (1) (3) στην Ευρωπαϊκή Ένωση, για την εκτίμηση της επίδρασης χημικών ουσιών στην ανάπτυξη νεαρών ατόμων ιριδίζουσας πέστροφας *(Oncorynchus mykiss)* υπό συνθήκες συνεχούς ροής. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα καλώς τεκμηριωμένα είδη. Για παράδειγμα, υπάρχουν εμπειρίες από παρόμοιες δοκιμές με ζεβρόψαρα (*Danio rerio*) (2) (4) (5) και ρυζόψαρα (medaka, *Oryzias Wipes)* (6) (7) (8).

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Γ.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίδραση (LOEC): είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στην οποία παρατηρείται σημαντική επίδραση της ουσίας (με $\rho < 0,05$) όταν συγκρίνεται με τον μάρτυρα. Όλες όμως οι χρησιμοποιούμενες στη δοκιμή πάνω από την LOEC συγκεντρώσεις πρέπει να έχουν επιβλαβή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC.

Συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC): είναι η αμέσως κάτω από την LOEC συγκέντρωση δοκιμής.

$\mathbf{EC_x}$: στην παρούσα μέθοδο δοκιμής, είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας η οποία προκαλεί × % απόκλιση στο βαθμό ανάπτυξης του ψαριού σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Πληθυσμιακός φόρτος: είναι το υγρό βάρος των ψαριών κατ' όγκο νερού.

Πυκνότητα πληθυσμού: είναι ο αριθμός των ψαριών κατ' όγκο νερού.

Ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης μεμονωμένου ψαριού: εκφράζει το βαθμό ανάπτυξης ενός μεμονωμένου ατόμου με βάση το αρχικό του βάρος.

Μέσος ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης δεξαμενής: εκφράζει το μέσο βαθμό ανάπτυξης του πληθυσμού μιας δεξαμενής σε μια ορισμένη συγκέντρωση.

«Ψευδο» ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης: εκφράζει το βαθμό ανάπτυξης μεμονωμένου ατόμου σε σύγκριση με το μέσο αρχικό βάρος του πληθυσμού μιας δεξαμενής.

▼B

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Νεαρά ψάρια στη φάση της εκθετικής ανάπτυξης φέρονται, αφού ζυγιστούν, σε θαλάμους δοκιμής και εκτίθενται σε μια σειρά υποθανατηφόρων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας διαλελυμένης σε νερό, κατά προτίμηση υπό συνθήκες συνεχούς ροής ή, αν δεν είναι δυνατό, υπό κατάλληλες ημιστατικές (στατική ανανέωση) συνθήκες. Η διάρκεια της δοκιμής είναι 28 ημέρες. Τα ψάρια τρέφονται καθημερινά. Το σιτηρέσιο βασίζεται στα αρχικά βάρη των ψαριών και μπορεί να αναπροσαρμοστεί μετά από 14 ημέρες. Στο τέλος της δοκιμής, τα ψάρια ξαναζυγίζονται. Οι επιπτώσεις στο βαθμό ανάπτυξης αναλύονται χρησιμοποιώντας μοντέλο αναγωγής για να εκτιμηθεί η συγκέντρωση που μπορεί να προκαλέσει *χ %* απόκλιση στο βαθμό ανάπτυξης, δηλαδή EC_X (π.χ.. EC_{10}, EC_{20}, ή EC_{30}). Εναλλακτικά, τα δεδομένα μπορούν να συγκριθούν με τιμές μαρτύρων για να προσδιοριστεί η κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίδραση (LOEC) και, κατά συνέπεια, η συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC).

1.4. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα τα αποτελέσματα δοκιμής οξείας τοξικότητας (βλέπε μέθοδο δοκιμής Γ.1) πραγματοποιηθείσας, κατά προτίμηση, με το είδος που επιλέχθηκε για τη δοκιμή αυτή. Αυτό σημαίνει ότι η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της υπό δοκιμή ουσίας είναι γνωστές και υπάρχει διαθέσιμη αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στα διαλύματα δοκιμής με γνωστή και δημοσιευμένη ορθότητα (accuracy) και όριο ανίχνευσης.

Στις χρήσιμες πληροφορίες περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα της ουσίας, η σταθερότητα στο νερό και το φως, η pK_a η P_{ow} και αποτελέσματα δοκιμής ως προς την άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (βλέπε μέθοδο δοκιμής Γ.4).

1.5. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, επιβάλλονται οι ακόλουθες συνθήκες:

— η θνησιμότητα στον ή στους μάρτυρες να μην υπερβαίνει το 10 % στο τέλος της δοκιμής,

— το μέσο βάρος των ψαριών στον ή στους μάρτυρες να έχει αυξηθεί αρκετά ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός της ελάχιστης απόκλισης του βαθμού ανάπτυξης που θεωρείται ως στατιστικώς σημαντική. Διεργαστηριακές δοκιμές (3) έχουν δείξει ότι για την ιριδίζουσα πέστροφα, το μέσο βάρος των ψαριών στους μάρτυρες πρέπει να έχει αυξηθεί τουλάχιστον κατά το ήμισυ (δηλαδή κατά 50 %) του μέσου αρχικού τους βάρους μέσα σε 28 ημέρες, π.χ., αρχικό βάρος 1 g/ψάρι (= 100 %), τελικό βάρος μετά 28 ημέρες: > 1,5 g/ψάρι (> 150 %),

— η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου να είναι τουλάχιστον το 60 % της τιμής κορεσμού σε αέρα (ΤΚΑ) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής,

— η θερμοκρασία του νερού μεταξύ των θαλάμων δοκιμής να μη διαφέρει περισσότερο του ± 1 °C σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της δοκιμής και να διατηρείται με δυνατότητα απόκλισης 2 °C στην περιοχή των θερμοκρασιών που ορίζεται για το υπό δοκιμή είδος (προσάρτημα 1).

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1. **Εξοπλισμός**

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

α) οξυγονόμετρο και pHμετρο·

▼B

β) εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και αλκαλικότητας του νερού·

γ) κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο της θερμοκρασίας με δυνατότητα συνεχούς, κατά προτίμηση, παρακολούθησης·

δ) δεξαμενές κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό και κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τη συνιστώμενη φόρτιση και την πυκνότητα πληθυσμού (βλέπε σημείο 1.8.5 και παράρτημα 1)·

ε) ζυγός κατάλληλης ορθότητας (δηλαδή ορθότητα έως ± 0,5 %).

1.6.2. **Νερό**

Ως νερό δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε νερό στο οποίο το υπό δοκιμή είδος εμφανίζει την ενδεδειγμένη μακροπρόθεσμη επιβίωση και ανάπτυξη. Θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Το pH του νερού θα πρέπει να είναι της τάξεως του 6,5 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να κυμαίνεται πέραν των ± 0,5 μονάδων pH. Η σκληρότητα συνιστάται να είναι πάνω από 140 mg/l (ως $CaC0_3$). Για να εξασφαλίζεται ότι το νερό αραίωσης δεν θα επηρεάσει το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. με τη δημιουργία συμπλόκων με την υπό δοκιμή ουσία), θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν το νερό αραίωσης είναι γνωστό ως σχετικώς σταθερό από ποιοτικής πλευράς, θα πρέπει, π.χ. κάθε τρεις μήνες, να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd και Ni), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca, Mg, Na, K, C1 και $S0_4$), γεωργικών φαρμάκων (π.χ. συνολικών οργανοφωσφορικών και συνολικών οργανοχλωριούχων φαρμάκων), ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών σωματιδίων. Εάν η ποιότητα του νερού έχει αποδειχθεί ότι μένει σταθερή για ένα, τουλάχιστον, χρόνο, τότε οι μετρήσεις μπορούν να γίνονται σε αραιότερα χρονικά διαστήματα (π.χ. κάθε έξι μήνες). Μερικά χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραίωσης καταγράφονται στο παράρτημα 2.

1.6.3. **Διαλύματα δοκιμής**

Τα διαλύματα δοκιμής των επιλεγόμενων συγκεντρώσεων παρασκευάζονται με αραίωση αρχικού διαλύματος.

Το αρχικό διάλυμα θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό του διαλύματος, χρησιμοποιώντας μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση ή υπερήχους). Για την επίτευξη κατάλληλου πυκνού αρχικού διαλύματος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες κορεσμού (στήλες διαλυτότητας).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, για την παρασκευή κατάλληλου πυκνοί[1] αρχικού διαλύματος, απορεί να απαιτείται η χρήση διαλυτών η διασπαρτικών μέσων (μέσων διαλυτοποίησης. Παραδείγματα κατάλληλων διαλυτών αποτελούν η ακετόνη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, το διμεθυλοσουλφοξείδιο, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη. Παραδείγματα κατάλληλων διασπαρτικών μέσων είναι τα Cremophor RH40, Tween 80, Methylcellulose 0,01 % και HCO-40. Όταν χρησιμοποιούνται ευκόλως βιοαποικοδομήσιμα μέσα (π.χ. ακετόνη) ή/και λίαν πτητικές ενώσεις, θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή καθώς είναι ενδεχόμενο, σε δοκιμές συνεχούς ροής, να προκληθούν προβλήματα με ανάπτυξη βακτηρίων. Όταν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, αυτό δεν πρέπει να εμφανίζει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των ψαριών ούτε ορατά δυσμενή αποτελέσματα στα νεαρά ψάρια που να μπορούν να γίνουν αντιληπτά με απλό και μόνο έλεγχο του διαλύτη.

▼B

Στην περίπτωση δοκιμών συνεχούς ροής, για την επίτευξη των διαφόρων συγκεντρώσεων στους θαλάμους δοκιμών, απαιτείται σύστημα το οποίο να προσάγει συνεχώς και να αραιώνει αρχικό διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας (π.χ. μετρητική αντλία, αναλογικό αραιωτή, σύστημα κορεσμού). Οι ταχύτητες ροής των αρχικών διαλυμάτων και του νερού αραίωσης θα πρέπει να ελέγχονται κατά διαστήματα, κατά προτίμηση κάθε μέρα, κατά τη διάρκεια της δοκιμής και δεν θα πρέπει να κυμαίνονται περισσότερο από 10 % σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Διεργαστηριακή δοκιμή (3) έδειξε ότι, όσον αφορά την ιριδίζουσα πέστροφα, συχνότητα απομάκρυνσης νερού κατά τη διάρκεια της δοκιμής της τάξης των 6 λίτρων/g ψαριού/ημέρα είναι αποδεκτή (βλέπε σημείο 1.8.2.2).

Σε ημιστατικές (ανανέωσης) δοκιμές, η συχνότητα μέσης ανανέωσης εξαρτάται από τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας, συνιστάται όμως η καθημερινή ανανέωση του νερού. Εάν, από προκαταρκτικές δοκιμές σταθερότητας (βλέπε σημείο 1.4), η συγκέντρωση της υπό δοκιμής ουσίας δεν είναι σταθερή (δηλαδή είναι εκτός της περιοχής του 80-120 % της ονομαστικής ή πέφτει κάτω από το 80 % της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης) κατά την περίοδο ανανέωσης, θα πρέπει να εξετάζεται η περίπτωση χρήσης της δοκιμής συνεχούς ροής.

1.6.4. **Επιλογή του είδους**

Για την παρούσα δοκιμή, το συνιστώμενο είδος είναι η ιριδίζουσα πέστροφα *(Oncorhynchus mykiss),* επειδή υπάρχουν μεγαλύτερες εμπειρίες για το είδος αυτό από διεργαστηριακές δοκιμές (1) (3). Ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα καλώς τεκμηριωμένα είδη, η διαδικασία όμως δοκιμής μπορεί να πρέπει να προσαρμοστεί για να ληφθούν οι κατάλληλες συνθήκες δοκιμής. Για παράδειγμα, εμπειρίες υπάρχουν και από τα ζεβρόψαρα *(Danio rerio*) (4) (5) και από τα ρυζόψαρα (medaka, *Oryzias latipes*) (6) (7) (8). Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να αναφέρεται η αιτιολογία της επιλογής του είδους και η πειραματική μέθοδος.

1.6.5. **Διατήρηση των ψαριών**

Τα προς δοκιμή ψάρια επιλέγονται από μεμονωμένο αρχικό πληθυσμό, κατά προτίμηση της αυτής ωοτοκίας, που έχει διατηρηθεί για δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από τη δοκιμή, υπό συνθήκες ποιότητας νερού και φωτισμού παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Θα πρέπει να διατρέφονται με σιτηρέσιο αντιστοιχούν κατ' ελάχιστο στο 2 % βάρους σώματος ανά ημέρα και, κατά προτίμηση, στο 4 % βάρους σώματος ανά ημέρα, καθ' όλη την περίοδο διατήρησης και κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Αφού περάσει ένα προκαταρκτικό 48ωρο διάστημα, καταγράφονται τα ποσοστά θνησιμότητας και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

— ποσοστά θνησιμότητας άνω του 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα,

— ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ 5 % και 10 % του πληθυσμού: εγκλιματισμός για επτά ακόμη ημέρες. Εάν, κατά τη διάρκεια των επτά επόμενων ημερών, καταγραφεί ποσοστό θνησιμότητας άνω του 5 %, ολόκληρη η παρτίδα απορρίπτεται,

— ποσοστά θνησιμότητας λιγότερο από το 5 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: η παρτίδα γίνεται αποδεκτή.

Τις δύο εβδομάδες που προηγούνται ή κατά τη διάρκεια της δοκιμής, τα ψάρια δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε αγωγή για ασθένεια.

▼B

1.7. ΣΧΕΔΙΟ ΔΟΚΙΜΗΣ

Ο όρος «σχέδιο δοκιμής» αναφέρεται στην επιλογή του αριθμού και της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής, στον αριθμό των δεξαμενών για κάθε συγκέντρωση και στον αριθμό των ψαριών ανά δεξαμενή. Θεωρητικά, το σχέδιο δοκιμής θα πρέπει να επιλέγεται ανάλογα με:

α) το στόχο της μελέτης·

β) τη μέθοδο στατιστικής ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί·

γ) τη διαθεσιμότητα και το κόστος των πόρων του πειράματος.

Στη δήλωση του στόχου θα πρέπει, αν είναι δυνατόν, να προσδιορίζεται η στατιστική ισχύς με την οποία απαιτείται να ανιχνευθεί ένα δεδομένο εύρος διαφοράς (π.χ. στο βαθμό ανάπτυξης) ή, εναλλακτικά, η ακρίβεια με την οποία απαιτείται να εκτιμηθεί η EC_X (π.χ. με χ = 10, 20 ή 30 και, κατά προτίμηση, όχι λιγότερο από 10). Χωρίς αυτό, δεν μπορεί να δοθεί σταθερή προδιαγραφή του μεγέθους της μελέτης.

Είναι σημαντικό να γίνει αντιληπτό ότι ένα σχέδιο που είναι άριστο (επιτυγχάνει τη βέλτιστη χρήση πόρων) για χρήση με μια μέθοδο στατιστικής ανάλυσης δεν είναι, κατ' ανάγκη, άριστο και για μιαν άλλη. Το συνιστώμενο σχέδιο για την εκτίμηση μιας τιμής LOEC/NOEC μπορεί, συνεπώς, να μην είναι ίδιο με εκείνο που συνιστάται για τη μέθοδο της ανάλυσης με αναγωγή (analysis by regression).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανάλυση με αναγωγή είναι προτιμότερη από την ανάλυση μεταβλητότητας (analysis of variance), για λόγους που αναφέρονται από τους Stephan και Rogers (9). Εντούτοις, όταν δεν βρίσκεται κατάλληλο μοντέλο αναγωγής ($r^2 < 0,9$), θα πρέπει να χρησιμοποιείται η τιμή NOEC/LOEC.

1.7.1. **Σχέδιο για ανάλυση με αναγωγή**

Τα σημεία που πρέπει να λαμβάνονται ιδιαίτερα υπόψη στο σχέδιο δοκιμής στην οποία θα εφαρμοστεί ανάλυση με αναγωγή είναι:

α) η συγκέντρωση επίδρασης (π.χ. $EC_{10,\ 20,\ 30}$) και η περιοχή των συγκεντρώσεων η οποία ενδιαφέρει σε σχέση με την επίδραση της υπό δοκιμή ουσίας, θα πρέπει, κατ' ανάγκη, να καλύπτεται από τις συγκεντρώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Άριστη ακρίβεια στις εκτιμήσεις των συγκεντρώσεων επίδρασης επιτυγχάνεται αν η συγκέντρωση επίδρασης βρίσκεται στο μέσον της περιοχής συγκεντρώσεων της δοκιμής. Για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής, ιδιαίτερα χρήσιμη μπορεί να αποδειχθεί η πραγματοποίηση μιας προκαταρκτικής δοκιμής προσανατολισμού·

β) για την επίτευξη ικανοποιητικής στατιστικής εικόνας, η δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει μία τουλάχιστον δεξαμενή-μάρτυρα και πέντε επιπλέον δεξαμενές με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Όπου χρειάζεται, όταν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, εκτός από τη σειρά δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιείται και μάρτυρας που να περιέχει το μέσο διαλυτοποίησης στην υψηλότερη υπό δοκιμή συγκέντρωση (βλέπε σημεία 1.8.3 και 1.8.4)·

γ) μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλη γεωμετρική ή λογαριθμική σειρά (10) (βλέπε προσάρτημα 3). Προτιμάται η χρησιμοποίηση λογαριθμικής κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής·

▼B

δ) εάν υπάρχουν διαθέσιμες περισσότερες από έξι δεξαμενές, οι επιπλέον δεξαμενές θα πρέπει ή να χρησιμοποιούνται για επανάληψη, ή να κατανέμονται στην περιοχή συγκεντρώσεων για να επιτυγχάνεται πυκνότερη κλιμάκωση των επιπέδων συγκέντρωσης Οποιοδήποτε από τα δύο είναι εξίσου επιθυμητό.

1.7.2. **Σχέδιο υπολογισμού τιμής NOEC/LOEC με τη μέθοδο της ανάλυσεως μεταβλητότητας (ANOVA)**

Για κάθε συγκέντρωση θα πρέπει, κατά προτίμηση, να υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης, η δε στατιστική ανάλυση θα πρέπει να γίνεται σε επίπεδο δεξαμενής (11). Χωρίς δεξαμενές επανάληψης, δεν μπορεί να γίνει δεκτή καμία μεταβλητότητα μεταξύ δεξαμενών πέραν εκείνης που οφείλεται σε μεμονωμένα ψάρια. Εντούτοις, η εμπειρία έχει δείξει (12) ότι η μεταξύ δεξαμενών μεταβλητότητα είναι πολύ μικρή σε σύγκριση με την εντός δεξαμενής (δηλαδή μεταξύ ψαριών) μεταβλητότητα στην εξεταζόμενη περίπτωση. Συνεπώς, μια σχετικώς αποδεκτή εναλλακτική λύση είναι η εκτέλεση στατιστικής αναλύσεως σε επίπεδο μεμονωμένων ψαριών.

Συμβατικά, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής σε γεωμετρική σειρά με λόγο, κατά προτίμηση, μη υπερβαίνοντα το 3,2.

Γενικά, όταν εκτελούνται δοκιμές με δεξαμενές επανάληψης, ο αριθμός των δεξαμενών-μαρτύρων επανάληψης και, κατά συνέπεια, ο αριθμός των ψαριών θα πρέπει να είναι διπλάσιος από τον αριθμό που υπάρχει σε κάθε μία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, που θα πρέπει να είναι του αυτού μεγέθους (13) (14) (15). Αντίθετα, εφόσον δεν υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης, ο αριθμός των ψαριών στην ομάδα των μαρτύρων θα πρέπει να είναι ίδιος με τον αριθμό σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής.

Εάν η ANOVA πρόκειται να βασιστεί σε δεξαμενές και όχι σε μεμονωμένα ψάρια [πράγμα που σημαίνει είτε την κατ' άτομο σήμανση των ψαριών είτε τη χρήση «ψευδό» ιδιαίτερων βαθμών ανάπτυξης (βλέπε σημείο 2.1.2)], είναι ανάγκη να υπάρχουν αρκετές δεξαμενές επανάληψης για να μπορεί να προσδιοριστεί η τυπική απόκλιση των «εντός δεξαμενής συγκεντρώσεων». Αυτό σημαίνει ότι οι βαθμοί ελευθερίας σφάλματος στην ανάλυση αποκλίσεων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 5 (11). Εάν μόνο για τους μάρτυρες υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης, υπάρχει κίνδυνος αποκλίσεων στη μεταβλητότητα σφάλματος, επειδή αυτή μπορεί να αυξάνεται με τη μέση τιμή του υπό εξέταση βαθμού ανάπτυξης. Εφόσον ο βαθμός ανάπτυξης είναι πιθανόν να μειωθεί με την αύξηση της συγκεντρώσεως, αυτό θα τείνει να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της μεταβλητότητας.

1.8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.8.1. **Επιλογή και ζύγιση των υπό δοκιμή ψαριών**

Είναι σημαντικό να ελαχιστοποιείται η διακύμανση του βάρους των ψαριών στην αρχή της δοκιμής. Κατάλληλες περιοχές μεγεθών για τα διάφορα είδη που συνιστώνται για χρήση στη δοκιμή αυτή, δίνονται στο προσάρτημα 1. Για το σύνολο της παρτίδας ψαριών που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, το εύρος των ατομικών βαρών στην έναρξη της δοκιμής θα πρέπει, θεωρητικά, να κρατιέται στα όρια του ± 10 % του αριθμητικού μέσου βάρους, σε κάθε δε περίπτωση, δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 25 %. Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα ψαριών, για να εκτιμάται το μέσο βάρος.

▼B

Για 24 ώρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, θα πρέπει να μην δίνεται τροφή στον αρχικό πληθυσμό. Τα ψάρια θα πρέπει κατόπιν να επιλέγονται στην τύχη. Χρησιμοποιώντας ένα γενικό αναισθητικό [π.χ. υδατικό διάλυμα 100 mg/l μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης (MS 222) εξουδετερωμένο με προσθήκη δύο μερών διτανθρακικού νατρίου ανά μέρος MS 222], τα ψάρια θα πρέπει να ζυγίζονται κατ' άτομο για την εύρεση του υγρού βάρους (στέγνωμα με στυπόχαρτο) με την ακρίβεια που προβλέπεται στο προσάρτημα 1. Όσα ψάρια έχουν βάρος εντός της προβλεπόμενης περιοχής θα πρέπει να κρατούνται και κατόπιν να κατανέμονται τυχαία μεταξύ των δοχείων δοκιμής. Το συνολικό υγρό βάρος των ψαριών σε κάθε δοχείο δοκιμής θα πρέπει να καταγράφεται. Η χρήση του αναισθητικού, όπως και η μεταχείριση των ψαριών (συμπεριλαμβανομένης της στύπωσης και της ζύγισης), μπορεί να προκαλέσει άγχος και τραυματισμούς στα νεαρά ψάρια, ιδιαίτερα στα είδη εκείνα που είναι μικρού μεγέθους. Συνεπώς, ο χειρισμός των νεαρών ψαριών πρέπει να γίνεται με ύψιστη προσοχή, ώστε να αποφεύγονται άγχη και τραυματισμοί για τα υπό δοκιμή ζώα.

Τα ψάρια ζυγίζονται πάλι την 28η ημέρα της δοκιμής (βλέπε σημείο 1.8.6). Εντούτοις, εάν κριθεί αναγκαίο να επανυπολογιστεί το σιτηρέσιο, τα ψάρια μπορούν να ζυγιστούν πάλι τη 14η ημέρα της δοκιμής (βλέπε σημείο 1.8.2.3). Για τον προσδιορισμό των μεταβολών στο μέγεθος των ψαριών μπορεί να χρησιμοποιηθεί και άλλη μέθοδος, όπως η φωτογραφική μέθοδος, μέσω της οποίας μπορεί να προσαρμοστεί το σιτηρέσιο.

1.8.2. **Συνθήκες έκθεσης**

1.8.2.1. *Διάρκεια*

Η διάρκεια της δοκιμής είναι > 28 ημέρες.

1.8.2.2. *Πληθυσμιακός φόρτος και πυκνότητα πληθυσμού*

Είναι σημαντικό, ο πληθυσμιακός φόρτος και η πυκνότητα πληθυσμού να είναι κατάλληλα για το χρησιμοποιούμενο είδος ψαριών (βλέπε προσάρτημα 1). Εάν η πυκνότητα πληθυσμού είναι πολύ υψηλή, τότε δημιουργείται συμφορητικό άγχος που οδηγεί σε μείωση του βαθμού ανάπτυξης και, ενδεχομένως, στην εμφάνιση ασθενειών. Εάν είναι πολύ χαμηλή, μπορεί να προκληθεί χωροκατακτητική συμπεριφορά που μπορεί, επίσης, να επιδράσει στην ανάπτυξη. Σε κάθε περίπτωση, ο πληθυσμιακός φόρτος θα πρέπει να είναι αρκετά χαμηλός για να μπορεί να διατηρείται, χωρίς αερισμό, συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου τουλάχιστον 60 % ΤΚΑ. Διεργαστηριακή δοκιμή (3) έχει δείξει ότι, για την ιριδίζουσα πέστροφα, πληθυσμιακός φόρτος της τάξης των 16 ατόμων των 3-5 g σε όγκο 40 λίτρων, είναι αποδεκτός. Η συνιστώμενη συχνότητα απομάκρυνσης νερού κατά τη διάρκεια της δοκιμής είναι 6 λίτρα/g ψαριών/ημέρα.

1.8.2.3. *Διατροφή*

Τα ψάρια θα πρέπει να διατρέφονται με κατάλληλη τροφή (προσάρτημα 1) και σε επίπεδα επαρκή για την επίτευξη αποδεκτού βαθμού ανάπτυξης. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η ανάπτυξη μικροβίων και η εμφάνιση θολότητας στο νερό. Στην περίπτωση της ιριδίζουσας πέστροφας, επίπεδα της τάξης του 4 % του σωματικού τους βάρους ανά ημέρα ικανοποιεί πιθανόν αυτές τις συνθήκες (3) (16) (17) (18). Το ημερήσιο σιτηρέσιο μπορεί να διαιρείται σε δύο ίσα μέρη και να δίνεται στα ψάρια σε δύο δόσεις την ημέρα, διαχωριζόμενες από χρονικό διάστημα 5 τουλάχιστον ωρών. Το σιτηρέσιο βασίζεται στο αρχικό συνολικό βάρος των ψαριών για κάθε δοχείο δοκιμής. Εάν τα ψάρια ζυγιστούν πάλι τη 14η ημέρα, το σιτηρέσιο επανυπολογίζεται. Για 24 ώρες πριν από τη ζύγιση, δεν θα πρέπει να δίνεται τροφή στα ψάρια.

▼B

Τα υπολείμματα των τροφών και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοχεία δοκιμής κάθε μέρα με προσεκτικό καθαρισμό του πυθμένα κάθε δεξαμενής με ρόφηση.

1.8.2.4. *Φως και θερμοκρασία*

Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι κατάλληλες νια το υπό δοκιμή είδος (προσάρτημα 1).

1.8.3. **Συγκεντρώσεις δοκιμής**

Κανονικά, ανεξάρτητα από το σχέδιο δοκιμής, απαιτούνται πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας (βλέπε σημείο 1.7.2. Εάν η τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας είναι γνωστή εκ των προτέρων (π.χ. από μελέτες οξείας τοξικότητας ή/και προσανατολισμού ως προς την περιοχή), αυτό απορεί να βοηθήσει στην επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής. Εφόσον χρησιμοποιούνται λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις. αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται. Η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το όριο διαλυτότητας της ουσίας στο νερό.

Όταν, για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος, χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, η τελική του συγκέντρωση δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,1 ml/l ενώ, κατά προτίμηση, θα πρέπει να είναι η ίδια σε όλα τα δοχεία δοκιμής (βλέπε σημείο 1.6.3). Εντούτοις, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια αποφυγής χρήσης παρόμοιων υλικών.

1.8.4. **Μάρτυρες**

Ο αριθμός των χρησιμοποιουμένων ως μαρτύρων υδατικών αραιώσεων εξαρτάται από το σχέδιο δοκιμής (βλέπε σημεία 1.7-1.7.2). Εάν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιείται και ίδιος αριθμός μαρτύρων με μέσο διαλυτοποίησης με εκείνο των υδατικών αραιώσεων-μαρτύρων.

1.8.5. **Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων**

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, προσδιορίζονται σε τακτικά διαστήματα οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας (βλέπε κατωτέρω}.

Στις δοκιμές συνεχούς ροής, θα πρέπει, κατά διαστήματα, να ελέγχονται οι ταχύτητες ροής του αραιωτικού και του τοξικού αρχικού διαλύματος, κατά προτίμηση ημερησίως, και δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν διακύμανση άνω του 10 % καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Όταν οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να παραμείνουν στα όρια του ± 20 % των ονομαστικών τιμών (δηλαδή στην περιοχή του 80-120 %, βλέπε σημεία 1.6.2 και 1.6.3), συνιστάται, στην έναρξη της δοκιμής και, στη συνέχεια, κάθε εβδομάδα, να ελέγχονται τουλάχιστον η υψηλότερη και η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής. Σε δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να μην παραμείνει στα όρια του ± 20 % της ονομαστικής (με βάση τα δεδομένα σταθερότητας της υπό δοκιμή ουσίας), είναι αναγκαίο να ελέγχονται όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής, με το ίδιο πάντα καθεστώς.

Στις ημιστατικές (ανανέωσης) δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να παραμείνει στα όρια του ± 20 % των ονομαστικών τιμών, συνιστάται, κατ' ελάχιστο, να ελέγχονται η υψηλότερη και η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής αμέσως μετά την παρασκευή και αμέσως πριν από την ανανέωση στην έναρξη της μελέτης και, στη συνέχεια, κάθε βδομάδα. Σε δοκιμές όπου η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας προβλέπεται να μην παραμείνει στα όρια του ± 20 % της ονομαστικής, είναι αναγκαίο να ελέγχονται όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής, με το ίδιο καθεστώς όπως και για τις σταθερότερες σταθερές ουσίες.

▼B

Συνιστάται τα αποτελέσματα να βασίζονται σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Εντούτοις, εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα διατηρείται ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τότε τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές.

Ορισμένα δείγματα μπορεί να χρειάζεται να διηθηθούν (π.χ. χρησιμοποιώντας διηθητικό μέσο με πόρους διαμέτρου 0,45 μm) ή να φυγοκεντρηθούν. Η μέθοδος που συνιστάται είναι η φυγοκέντρηση. Πάντως, εφόσον η υπό δοκιμή ουσία δεν απορροφάται στο φίλτρο, μπορεί να γίνει δεκτή και η διήθηση.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, σε όλα τα δοχεία δοκιμής 3α πρέπει να μετρώνται το διαλελυμένο οξυγόνο, το pH και η θερμοκρασία. Στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο με τη υψηλότερη συγκέντρωση, θα πρέπει να μετράται η ολική σκληρότητα, η αλκαλικότητα και η αλατότητα (εφόσον συντρέχει περίπτωση). Το διαλελυμένο οξυγόνο και η αλατότητα (εάν συντρέχει περίπτωση) θα πρέπει να μετρώνται κατ' ελάχιστο τρεις φορές (στην αρχή, στο μέσον και στο τέλος της δοκιμής). Στις ημιστατικές δοκιμές, συνιστάται το διαλελυμένο οξυγόνο να μετριέται συχνότερα, κατά προτίμηση πριν και μετά από κάθε ανανέωση του νερού ή, τουλάχιστον, μία φορά την εβδομάδα. Το pH θα πρέπει να μετριέται στην αρχή και στο τέλος κάθε ανανέωσης νερού σε στατικές δοκιμές ανανέωσης και μια φορά τουλάχιστον τη βδομάδα σε δοκιμές συνεχούς ροής. Η σκληρότητα και η αλκαλικότητα θα πρέπει να μετρώνται μια φορά σε κάθε δοκιμή. Η θερμοκρασία θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα, τουλάχιστον, δοχείο δοκιμής.

1.8.6. **Παρατηρήσεις**

Βάρος: Στο τέλος της δοκιμής όλα τα επιζώντα ψάρια πρέπει να ζυγίζονται σε υγρή κατάσταση (στέγνωμα με στυπόχαρτο) είτε σε ομάδες κατά δοχείο δοκιμής, είτε μεμονωμένα. Η ζύγιση των ζώων κατά δοχείο δοκιμής προτιμάται από την κατ' άτομο ζύγιση που απαιτεί τη σήμανση κάθε ψαριού. Στην περίπτωση της κατ' άτομο μέτρησης του βάρους για τον προσδιορισμό του ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης μεμονωμένων ψαριών, η τεχνική σήμανσης θα πρέπει να επιλέγεται έτσι ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία άγχους στα ζώα (αντί της ψυχρής σήμανσης, μπορεί να είναι κατάλληλος κάποιος εναλλακτικός τρόπος, π.χ. η χρήση χρωματισμένης λεπτής τριχιάς).

Τα ψάρια θα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου της δοκιμής και να σημειώνεται οποιαδήποτε εξωτερική ανωμαλία (όπως, π.χ. αιμορραγία, αποχρωματισμός) και μη φυσιολογική συμπεριφορά. Θα πρέπει να σημειώνεται κάθε τυχόν περίπτωση θανάτου και τα νεκρά ψάρια να απομακρύνονται το ταχύτερο δυνατό. Τα νεκρά ψάρια δεν αντικαθίστανται, αφού ο πληθυσμιακός φόρτος και η πυκνότητα πληθυσμού επαρκούν για την αποφυγή επιδράσεων στην ανάπτυξη λόγω μεταβολής του αριθμού των ψαριών ανά δεξαμενή. Τα επίπεδα, όμως, του συντηρεσίου θα πρέπει να προσαρμόζονται.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Συνιστάται τόσο στο σχέδιο, όσο και στην ανάλυση της δοκιμής να συμμετέχει και ένας στατιστικολόγος, δεδομένου ότι η μέθοδος αυτή δοκιμής προσφέρει τη δυνατότητα σημαντικών μεταβολών στο σχεδιασμό του πειράματος όπως, π.χ., στον αριθμό των θαλάμων δοκιμής, στον αριθμό των συγκεντρώσεων δοκιμής, στον αριθμό των ψαριών, κ.λπ. Δεδομένου ότι στο σχέδιο δοκιμής υπάρχει δυνατότητα διαφόρων επιλογών, εδώ δεν δίνονται ειδικές οδηγίες για τη στατιστική διαδικασία.

▼B

Σε δοχεία δοκιμής στα οποία η θνησιμότητα υπερβαίνει το 10 %, δεν θα πρέπει να υπολογίζονται βαθμοί ανάπτυξης. Εντούτοις, σε όλες τις συγκεντρώσεις δοκιμής, θα πρέπει να αναφέρεται το ποσοστό θνησιμότητας.

Όποια μέθοδος κι να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των δεδομένων, η κεντρική ιδέα είναι ο ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης r μεταξύ χρόνου t_1 και χρόνου t_2. Αυτός μπορεί να οριστεί με διάφορους τρόπους, ανάλογα με το εάν τα ψάρια είναι επισημασμένα ή όχι κατ' άτομο ή με το εάν απαιτείται μέσος όρος δεξαμενής.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

όπου,

r_1 = ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης μεμονωμένων ψαριών

r_2 = μέσος ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης δεξαμενής

r_3 = «ψευδό-» ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης

w_1, w_2 = βάρη ενός συγκεκριμένου ψαριού κατά τις χρονικές στιγμές t_1 και t_2, αντίστοιχα

$\log_e w_1$ = λογάριθμος του βάρους ενός μεμονωμένου ψαριού στην αρχή της μελέτης

$\log_e w_2$ = λογάριθμος του βάρους ενός μεμονωμένου ψαριού στο τέλος της μελέτης

$\log_e W_1$ = μέση τιμή των λογαρίθμων των τιμών v_1, για τα ψάρια στη δεξαμενή στην αρχή της μελέτης

$\log_e W_2$ = μέση τιμή των λογαρίθμων των τιμών W_2 για τα ψάρια στη δεξαμενή στο τέλος της μελέτης

t_1, t_2 = χρονική στιγμή (ημέρες) έναρξης και τέλους της μελέτης

r_1, r_2, r_3 μπορούν να υπολογιστούν για την περίοδο 0-28η ημέρα και, όπου χρειάζεται (δηλαδή, όταν έχει πραγματοποιηθεί μέτρηση κατά την 14η ημέρα) για τις περιόδους 0-14η και 14-28η ημέρα.

2.1.1. **Ανάλυση αποτελεσμάτων με αναγωγή (μοντέλο συγκέντρωσης-απόκρισης)**

Η μέθοδος αυτή ανάλυσης διαμορφώνει μια κατάλληλη μαθηματική σχέση μεταξύ του ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης και της συγκέντρωσης, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα εκτίμησης της «EC_x» δηλαδή οποιασδήποτε απαιτούμενης τιμής EC. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, δεν είναι αναγκαίος ο υπολογισμός του r για τα μεμονωμένα ψάρια (η) και η ανάλυση, α\τ' αυτού, μπορεί να βασιστεί στη μέση ανά δεξαμενή τιμή του r (r_2). Η τελευταία αυτή μέθοδος προτιμάται. Είναι επίσης καταλληλότερη στην περίπτωση χρήσης πολύ μικρών ειδών.

Ο μέσος ιδιαίτερος βαθμός ανάπτυξης δεξαμενής (r_2) θα πρέπει να παρίσταται γραφικά συναρτήσει της συγκεντρώσεως, για να ελέγχεται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης.

▼B

Για την έκφραση της σχέσης μεταξύ r_2 και συγκεντρώσεως, 3α πρέπει να επιλέγεται ένα κατάλληλο μοντέλο, η επιλογή του οποίου πρέπει να στηρίζεται σε κατάλληλη αιτιολόγηση.

Εάν οι αριθμοί των ψαριών που επέζησαν σε κάθε δεξαμενή είναι άνισοι, τότε η διεργασία της διαμόρφωσης του μοντέλου, απλό ή μη γραμμικά, θα πρέπει να σταθμίζεται έτσι ώστε να λαμβάνονται υπόψη τα άνισα μεγέθη των ομάδων.

Η μέθοδος της διαμόρφωσης του μοντέλου πρέπει να καθιστά δυνατή την επίτευξη εκτίμησης της, π.χ., EC_{20} και της διασποράς της (τυπικό σφάλμα ή εύρος εμπιστοσύνης). Το γράφημα του διαμορφωμένου μοντέλου θα πρέπει να παρουσιάζεται σε σχέση με τα δεδομένα έτσι ώστε να μπορεί να αποδειχθεί η καταλληλότητα της διαμόρφωσης του μοντέλου (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό της LOEC**

Εάν η δοκιμή περιέλαβε δοκιμές επανάληψης σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης, ο υπολογισμός της LOEC μπορεί να βασιστεί σε ανάλυση μεταβλητότητας (ANOVA) του μέσου ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης δεξαμενής (βλέπε σημείο 2.1), ακολουθούμενη από κατάλληλη μέθοδο [π.χ. δοκιμή Dunnett ή Williams (13) (14) (15) (22)] σύγκρισης του μέσου r για κάθε συγκέντρωση με το μέσο r για τους μάρτυρες για τον προσδιορισμό της κατώτατης συγκέντρωσης για την οποία η διαφορά αυτή είναι στατιστικώς σημαντική με στάθμη πιθανότητας 0,05. Εάν δεν πληρούνται οι υποθέσεις που απαιτούνται για παραμετρικές μεθόδους — μη κανονική κατανομή (π.χ. δοκιμή Shapiro-Wilk) ή ετερογενής μεταβλητότητα (variance) (δοκιμή Bartlett), θα πρέπει να εξεταστεί η μετατροπή των δεδομένων για την ομοιογενοποίηση των βαθμών μεταβλητότητας (variance) πριν από την εκτέλεση της ANOVA ή η εκτέλεση σταθμισμένης ANOVA.

Εάν η δοκιμή δεν περιλάμβανε δεξαμενές επανάληψης σε κάθε συγκέντρωση, η προσφυγή σε ANOVA με βάση τις δεξαμενές είναι χωρίς νόημα ή αδύνατη. Στην περίπτωση αυτή, ένας αποδεκτός συμβιβασμός είναι να στηρίξουμε την ANOVA στον «ψευδο» ιδιαίτερο βαθμό ανάπτυξης r_3 για μεμονωμένα ψάρια.

Ο μέσος r_3 για κάθε συγκέντρωση δοκιμής μπορεί στη συνέχεια να συγκριθεί με τον μέσο r_3 για τους μάρτυρες. Κατόπιν η LOEC μπορεί να προσδιοριστεί όπως προηγουμένως. Πρέπει να αναγνωριστεί ότι η μέθοδος αυτή δεν προσφέρει καμία ανοχή ούτε προστασία για περίπτωση μεταβλητότητας μεταξύ δεξαμενών, πέραν εκείνης που προβλέπεται για περιπτώσεις μεταβλητότητας μεταξύ επιμέρους ψαριών. Εντούτοις, η εμπειρία έχει δείξει (9) ότι η μεταξύ δεξαμενών μεταβλητότητα είναι πολύ μικρή σε σύγκριση με τη μεταβλητότητα εντός δεξαμενής (δηλαδή μεταξύ ψαριών). Εάν δεν περιλαμβάνονται μεμονωμένα ψάρια στην ανάλυση, πρέπει να παρέχεται μέθοδος μεμονωμένου προσδιορισμού και αιτιολόγηση για τη χρήση του.

2.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με ιδιαίτερη προσοχή όταν οι μετρούμενες τοξικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου ή, στις ημιστατικές δοκιμές, όταν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας μειώνεται στο διάστημα που μεσολαβεί από την παρασκευή του διαλύματος μέχρι πριν από την ανανέωση.

2.3. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

▼B

2.3.1. **Ουσία δοκιμής:**

— φυσική μορφή και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— στοιχεία χημικής αναγνώρισης, συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή ουσίας, όταν χρειάζεται.

2.3.2. **Είδος υπό δοκιμή:**

— επιστημονική ονομασία, πιθανόν,

— ποικιλία, μέγεθος, προμηθευτής, κάθε προηγούμενη αγωγή, κ.λπ.

2.3.3. **Συνθήκες δοκιμής:**

— χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (π.χ. ημιστατική/ανανέωση, συνεχής ροή, φόρτος, πυκνότητα πληθυσμού, κ.λπ.),

— σχέδιο δοκιμής (π.χ. αριθμός δοχείων δοκιμής, συγκεντρώσεις δοκιμής και επαναλήψεις, αριθμός ψαριών ανά δοχείο),

— μέθοδος παρασκευής αρχικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (πρέπει να δίδεται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωση του, όταν χρησιμοποιείται),

— οι ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, ο μέσος όρος των μετρηθεισών τιμών και οι τυπικές τους αποκλίσεις στα δοχεία δοκιμής και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν, καθώς και αποδεικτικά στοιχεία ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας σε αληθές διάλυμα,

— τα χαρακτηριστικά του νερού αραιώσεως: pH, σκληρότητα, αλκαλικότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (αν ανιχνεύεται), συνολικός οργανικός άνθρακας, αιωρούμενα στερεά, αλατότητα του μέσου δοκιμής (αν μετριέται) και κάθε άλλη πραγματοποιηθείσα μέτρηση,

— η ποιότητα μέσα στα δοχεία δοκιμής: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου,

— λεπτομερής ενημέρωση για τη διατροφή, [π.χ. τύπος τροφής(-ών), πηγή, ποσότητα και συχνότητα].

2.3.4. **Αποτελέσματα:**

— στοιχεία ότι οι μάρτυρες πληρούσαν το κριτήριο εγκυρότητας ως προς την επιβίωση, καθώς και στοιχεία για τις θνησιμότητες που εμφανίστηκαν σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής,

— χρησιμοποιηθείσες στατιστικές αναλυτικές τεχνικές, στατιστικά βασιζόμενα σε επαναλήψεις ή σε ψάρια, επεξεργασία των δεδομένων και αιτιολόγηση των χρησιμοποιηθεισών τεχνικών,

— στοιχεία με μορφή πινάκων για τα ατομικά και τα μέσα βάρη των ψαριών κατά τις ημέρες 0, 14 (εφόσον έγινε μέτρηση) και 28 και τις τιμές του μέσου ανά δεξαμενή ή ψευδο- ιδιαίτερου βαθμού ανάπτυξης (αναλόγως) για την περίοδο 0-28 ή, ενδεχομένως, 0-14 και 14-28,

— αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης (δηλαδή ανάλυση με αναγωγή ή ANOVA) κατά προτίμηση σε μορφή πίνακα και γραφική μορφή και η LOEC ($\rho = 0,05$) καθώς και η NOEC ή η EC_X μαζί, όταν είναι δυνατόν, με τα τυπικά σφάλματα, αναλόγως,

▼B

— στοιχεία για οποιαδήποτε ασυνήθη αντίδραση των ψαριών και κάθε ορατή επίδραση που προκλήθηκε από την υπό δοκιμή ουσία.

3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

(2) Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp. 231-236.

(3) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(4) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp. 1855-1870.

(5) Nagel R.. Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp. 157-164.

(6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(7) Holcombe, G. \V., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (199 5). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka *(Oryzias latipes).* Arch. Environ. Coma. Toxicol. 28, pp. 287-297.

(8) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes).* Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(9) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328-338.

(10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS l/RM/28, 81 pp.

(11) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(13) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

▼B

(14) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(15) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(16) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville K. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.

(17) Quinton,]. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory-growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus* mykiss. Journal of Fish Biology, 37, pp. 33-41.

(18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(19) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.

(20) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and Mclntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(22) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510-531.

▼B

Προσαρτημα 1

ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΠΑ ΤΙΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΕΙΔΗ ΨΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΛΗΛΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Είδος	Συνιστώμενη περίοχή θερμοκρασιών δοκιμής (T)	Φωτοπε ρίοδος (ώρες)	Συνισιώμενη περιοχή αρχικού βάρους ψαριών (8)	Απαιτούμενη ακρίβεια μέτρησης	Πληδυομιακός φόρτος (g/l)	Πυκνότητα πληθυσμού (ανά λίτρο)	Τροφή	Διάρκεια δοκιμής (ημέρες)
Συνιστώμενο είδος:								
Oncorhynchus mykiss πέστροφα	12,5-16,0	12-16	1-5	Στα πλησιέστερα 100 mg	1,2-2,0	4	Ξηρά σολομονοαδή ιχθύδια	≥ 28
Άλλα καλώς τεκμηριωμένα είδη:								
Danio rerio *Ζεβρόψαρα*	21-25	12-16	0,050-0,100	Στο πλησιέστερο 1 ing	0,2-1,0	5-10	Ζώοα τροφή *(Brachionus Artemia)*	> 28
Oryzias latipes Ρυξόψαρα (Medaka)	21-25	12-16	0,050-0,100	Στο πλησιέστερο 1 mg	0,2-1,0	5-20	Ζώσα τροφή (*Brachionus Anemia)*	> 28

▼B

Προσαρτημα 2

ΜΕΡΙΚΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΡΑΙΩΣΕΩΣ

Ουσία	Συγκεντρώσεις
Διαμερισμένη ύλη	< 20 mg/l
Συνολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/1
Μη ιοντισμένη αμμωνία	< 1 mg/1
Υπολειμματικό χλώριο	< 10 mg/1
Σύνολο οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	< 50 ng/l
Σύνολο οργανοχλωριούχων γεωργικών φαρμάκων μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/1
Συνολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/1

▼B

Προσαρτημα 3

Λογαριθμική Σειρά Συγκεντρώσεων Κατάλληλων Για Δοκιμή Τοξικότητας (9)

Στήλη (αριθμός συγκεντρώσεων μεταξύ 100 και 10 ή μεταξύ 10 και 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Από μια στήλη μπορεί να επιλεγεί μια σειρά πέντε (ή περισσότερων) διαδοχικών συγκεντρώσεων. Ενδιάμεσα σημεία μεταξύ συγκεντρώσεων στη στήλη (χ) βρίσκονται στη στήλη (2χ + 1). Οι καταγραφόμενες τιμές μπορεί να αντιπροσωπεύουν συγκεντρώσεις εκφραζόμενες ως % κατ όγκο ή κατά βάρος (mg/l μg/l). Οι τιμές μπορούν να πολλαπλασιαστούν ή να διαιρεθούν με οποιαδήποτε δύναμη του 10, αναλόγως, Η στήλη 1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί αν υφίσταται σημαντική αβεβαιότητα ως προς τα επίπεδα τοξικότητας.

▼B

Γ.15. **ΨΑΡΙΑ, ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΕΚΙΘΟΦΟΡΑ ΙΧΘΥΔΙΑ** (sac-fry stages)

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η εν λόγω μέθοδος μελέτης βραχυπρόθεσμης τοξικότητας αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 212 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος μελέτης της βραχυπρόθεσμης τοξικότητας στα έμβρυα ψαριών και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry stages) αποτελεί βραχυπρόθεσμη δοκιμασία στην οποία εκτίθενται τα ψάρια από το στάδιο του αβγού που μόλις έχει γονιμοποιηθεί έως το τέλος του σταδίου των λεκιθοφόρων ιχθυδίων (sac-fry stage). Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας δεν παρέχεται τροφή στα έμβρυα και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry), επομένως η δοκιμασία πρέπει να ολοκληρώνεται όσο τα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry) τρέφονται ακόμη από το λεκιθικό σάκο.

Σκοπός της δοκιμασίας είναι να οριστούν οι θανατηφόρες και, σε περιορισμένο βαθμό, οι σχεδόν θανατηφόρες επίπτώσης των χημικών ουσιών στα συγκεκριμένα στάδια εξέλιξης και στα συγκεκριμένα είδη. Από τη δοκιμασία μπορούν να ληφθούν χρήσιμες πληροφορίες καθώς α) μπορεί να αποτελέσει σύνδεσμο μεταξύ θανατηφόρων και σχεδόν θανατηφόρων δοκιμασιών β) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δοκιμασία επιλογής ενόψει είτε μιας (πλήρους) δοκιμασίας αρχικών σταδίων ζωής είτε μιας δοκιμασίας χρόνιας τοξικότητας και γ) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διεξαγωγή δοκιμασίας σε είδη όπου οι τεχνικές εκτροφής δεν είναι τόσο προηγμένες ώστε να καλύπτουν την περίοδο μετάβασης από την ενδογενή στην εξωγενή διατροφή.

Δεν πρέπει να λησμονείται το γεγονός ότι μόνο οι δοκιμασίες που περιλαμβάνουν όλα τα στάδια του κύκλου ζωής του ψαριού είναι σε θέση να παρέχουν ακριβή εκτίμηση της χρόνιας τοξικότητας των χημικών ουσιών στα ψάρια και ότι κάθε μειωμένης διάρκειας έκθεση όσον αφορά τα στάδια ζωής μπορεί να μειώσει την ευαισθησία και επομένως να οδηγήσει σε υποτίμηση της χρόνιας τοξικότητας. Επομένως αναμένεται ότι η δοκιμασία εμβρύου και λεκιθοφόρου ιχθυδίου (sac-fry) θα είναι λιγότερο ευαίσθητη από την πλήρη δοκιμασία αρχικών σταδίων ζωής, ιδίως όσον αφορά τις εξαιρετικά λιπόφιλες ουσίες (log P_{ow} > 4) και τις χημικές ουσίες ειδικής τοξικής δράσης. Για τις χημικές ουσίες μη ειδικής ναρκωτικής δράσης, ωστόσο, μπορεί να αναμένονται μικρότερες διαφορές ευαισθησίας μεταξύ των δύο δοκιμών (Γ).

Πριν τη δημοσίευση της παρούσας δοκιμασίας, σχεδόν όλα τα πειράματα στα έμβρυα και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac fry) πραγματοποιού\ταν με τους ιχθύς γλυκών υδάτων *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae — κοινή ονομασία ζεβρόψαρο). Για το λόγο αυτό, στο προσάρτημα Ι δίνονται λεπτομερείς οδηγίες για τη διεξαγωγή των δοκιμών στο εν λόγω είδος. Το γεγονός αυτό δεν αποκλείει τη χρήση άλλων ειδών με τα οποία έχουν ήδη πραγματοποιηθεί πειράματα (πίνακες 1Α και 1Β).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης: (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ότι μια ουσία έχει επίδραση στατιστικώς σημαντική ($\rho < 0,05$), συγκριτικά με τους μάρτυρες. Εντούτοις, όλες οι συγκεντρώσεις οι μεγαλύτερες από τη LOEC πρέπει να ασκούν βλαβερή επίδραση ισοδύναμη ή μεγαλύτερη από την παρατηρούμενη με τη LOEC.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): είναι η συγκέντρωση η αμέσως χαμηλότερη της LOEC

▼B

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Τα έμβρυα και λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry) εκτίθενται σε μια σειρά υδατικών διαλυμάτων της δοκιμαστικής ουσίας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το πρωτόκολλο επιτρέπει επιλογή μεταξύ μιας ημιστατικής διαδικασίας και μιας διαδικασίας συνεχούς ροής, ανάλογα με τη φύση της δοκιμαστικής ουσίας. Η δοκιμασία ξεκινάει με την τοποθέτηση γονιμοποιημένων αβγών στους δοκιμαστικούς θαλάμους και τελειώνει αμέσως πριν απορροφηθεί πλήρως ο λεκιθικός σάκος οποιασδήποτε προνύμφης (larvae) σε οποιονδήποτε από τους δοκιμαστικούς θαλάμους ή πριν σημειωθούν θάνατοι από ασιτία στους μάρτυρες. Οι θανατηφόρες και σχεδόν θανατηφόρες επιπτώσεις αξιολογούνται και συγκρί-νο\ται με τις τιμές των μαρτύρων για να καθοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης και επομένως η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης. Εναλλακτικά, μπορούν να αναλυθούν με βάση ένα αναγωγικό μοντέλο για να υπολογιστεί κατ εκτίμηση η συγκέντρωση που προκαλεί ένα δεδομένο ποσοστό επίδρασης (π.χ. LC; EC_X, όπου χ είναι καθορισμένη % επίπτωση).

1.4. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Πρέπει να είναι γνωστά τα αποτελέσματα μιας μελέτης οξείας τοξικότητας (βλέπε μέθοδο Γ.1) που πραγματοποιήθηκε κατά προτίμηση στα ίδια είδη με αυτά που έχουν επιλεγεί για την παρούσα δοκιμασία. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αποδειχτούν χρήσιμα για τη σωστή επιλογή μιας σειράς συγκεντρώσεων για τις δοκιμασίες αρχικών σταδίων ζωής. Η υδατοδιαλυτότητα (περιλαμβανομένης της διαλυτότητας στο νερό της δοκιμασίας) και η τάση ατμών της δοκιμαστικής ουσίας πρέπει να είναι γνωστά. Πρεπει επίσης να υπάρχει αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ουσίας στα διαλύματα, της οποίας η ακρίβεια και το όρια ανίχνευσης να είναι γνωστά και δημοσιευμένα.

Πληροφορίες σχετικές με την ουσία οι οποίες να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών της δοκιμασίας είναι ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η σταθερότητα στο φως, η σταθερότητα στις συνθήκες της δοκιμασίας, οι συντελεστές pKa, P_{ow} και τα αποτελέσματα μιας δοκιμασίας μελέτης της ευχέρειας βιοαποικοδόμησης (βλέπε μέθοδο Γ.4).

1.5. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμασίας είναι οι ακόλουθες:

— η συνολική επιβίωση των γονιμοποιημένων αβγών στους μάρτυρες και, κατά περίπτωση, στα δοχεία που περιέχουν μόνο διαλύτη, πρέπει να είναι ανώτερη ή ίση με τις τιμές που καθορίζονται στα προσαρτήματα 2 και 3,

— η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου πρέπει να κυμαίνεται από 60 έως 100 % της τιμής κορεσμού με αέρα (air saturation value -ASV) σε όλη τη δοκιμασία,

— η θερμοκρασία του ύδατος δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από ± 1,5 °C μεταξύ δοκιμαστικών θαλάμων και μεταξύ διαδοχικών ημερών σε οποιαδήποτε στιγμή της δοκιμασίας και πρέπει να βρίσκεται εντός των ορίων θερμοκρασίας που έχουν προσδιοριστεί για κάθε είδος ψαριού (προσαρτήματα 2 και 3).

▼B

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Δοκιμαστικοί θάλαμοι**

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν οποιαδήποτε δοχεία από γυαλί ή άλλο χημικά αδρανές υλικό. Οι διαστάσεις των δοχείων πρέπει να είναι αρκετά μεγάλες ώστε να ανταποκρίνονται στο ρυθμό πλήρωσης (βλέπε 1.7.1.2). Συνιστάται να τοποθετούνται οι δοκιμαστικοί θάλαμοι με τυχαίο τρόπο στο χώρο εκτέλεσης των δοκιμών. Εάν υπάρχουν στο εργαστήριο συστηματικές επιδράσεις που μπορούν να ελεγχθούν με ομαδοποίηση των δοκιμαστικών θαλάμων, τότε είναι προτιμότερη μια σχετικά τυχαία ομαδοποίηση των θαλάμων όπου κάθε ομάδα περιλαμβάνει καθεμιά από τις αγωγές, παρά μια τελείως τυχαία κατανομή. Όταν ο σχεδιασμός του πειράματος προβλέπει ομαδοποίηση, το δεδομένο αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την επακόλουθη ανάλυση των δεδομένων. Οι δοκιμαστικοί θάλαμοι προστατεύονται από ανεπιθύμητες οχλήσεις.

1.6.2. **Επιλογή είδους ψαριού**

Τα διάφορα είδη ψαριών που συνιστώνται για τη δοκιμασία περιλαμβάνονται στον πίνακα 1Α. Το γεγονός αυτό δεν αποκλείει τη χρήση άλλων ειδών (παραδείγματα δίνονται στον πίνακα 1Β), αρκεί η διαδικασία να προσαρμοστεί με τρόπο ώστε να επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες δοκιμασίας. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να αναφέρεται η αιτιολογία της επιλογής του είδους και της πειραματικής μεθόδου.

1.6.3. **Συντήρηση των γεννητόρων**

Λεπτομέρειες σχετικά με τη συντήρηση των γεννητόρων υπό ικανοποιητικές συνθήκες μπορούν να αναζητηθούν στο TG 210 του ΟΟΣΑ ([1]) και στις αναφορές (2), (3), (4), (5) και (6) της βιβλιογραφίας.

1.6.4. **Προετοιμασία των εμβρύων και των προνυμφών (larvae)**

Στο εσωτερικό του βασικού δοχείου, τα έμβρυα και οι προνύμφες (larvae) μπορούν να τοποθετηθούν σε μικρότερα δοχεία υε πλευρές ή απολήξεις από πλέγμα ώστε να επιτρέπεται η ροή του δοκιμαστικού διαλύματος μέσω του δοχείου. Για να μη είναι τυρβώδης η ροή, τα μικρά δοχεία αναρτώνται από βραχίονα ο οποίος τα ανεβοκατεβάζει, με τους οργανισμούς όμως σταθερά μέσα στο νερό μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σύστημα εκροής με σιφώνιο. Τα γονιμοποιημένα αβγά σολωμονοειδών μπορούν να τοποθετηθούν σε σχάρες ή σε πλέγματα με ανοίγματα αρκετά μεγάλα ώστε, μετά την εκκόλαψη, οι προνύιιφες να μπορούν να βγουν. Για την απομάκρυνση των εμβρύων και των προνυμφών (larvae) στις ηυιστατικές δοκιμασίες με πλήρη ημερήσια ανανέωση του νερού συνιστάται να χρησιμοποιούνται σιφώνια παστέρ.

Τα δοχεία, οι σχάρες και τα πλέγματα που χρησιμοποιούνται για τη συγκράτηση των αβγών εντός του βασικού δοχείου πρέπει να αφαιρούνται μετά την εκκόλαψη των προνυμφών ([1]), (larvae), εκτός από τα πλέγματα που χρειάζονται για να ιιη φύγουν τα ψάρια. Εάν οι προνύμφες (larvae) χρειαστεί να μεταφερθούν, δεν θα πρέπει να εκτεθούν στον αέρα και δεν 8α πρέπει να χρησιμοποιηθούν δίχτυα για την ελευθέρωση των ψαριών από τα δοχεία που περιέχουν τα αβγά (αυτές οι προφυλάξεις δεν είναι απαραίτητες για λιγότερα ευαισθητα είδη, όπως ο κυπρίνος). Η μεταφορά, η χρονική στιγμή της οποίας εξαρτάται από το είδος, δεν ειναι πάντοτε απαραίτητη. Για την ημιστατική τεχνική, απορούν να χρησιμοποιηθούν κύπελλα ή αβαθή δοχεία και, εάν χρειάζεται, να εξοπλιστούν με δικτυωτό προπέτασμα ελαφρώς υπερυψωμένο ως προς τον πυθμένα. Εάν ο όνκος των δοχείων ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις φορτωσης (βλέπε 1.7.1.2), τότε μπορεί να μην χρειαστεί η υεταφορά των εμβρύων ή των προνυυφών (larvae).

([1]) OECD. Paris. 1992, Test Guideline 210, «Fish. Early-life Stage Toxicity Test».

▼B

1.6.5. **Νερό**

Κάθε νερό που διαθέτει τα χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραίωσης τα οποία απαριθμούνται στο προσάρτημα 4 και στο οποίο τα δοκιμαζόμενα είδη σημειώνουν επιβίωση μαρτύρων τουλάχιστον ίση με την περιγραφόμενη στα προσαρτήματα 2 και 3, είναι κατάλληλο για τη δοκιμασία. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Το ρΗ πρέπει να κυμαίνεται κατά ± 0,5 ρΗ. Για να είναι βέβαιο ότι το νερό της αραίωσης δεν θα επηρεάσει κατά τρόπο ανεπιθύμητο το αποτέλεσμα της δοκιμασίας (π.χ., δημιουργώντας σύμπλοκα με την υπό δοκιμή ουσία) και τη συμπεριφορά των γεννητόρων, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν ένα νερό είναι γνωστό ότι είναι σχετικά σταθερό από πλευράς ποιότητας θα πρέπει, π.χ., κάθε τρεις μήνες, να γίνεται μέτρηση βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd και Νί), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca, Mg, Na, K, C1 και $S0_4$), φυτοφαρμάκων (π.χ. συνολικά οργανοφωσφορικά και συνολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα), συνολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών. Εάν η ποιότητα του νερού έχει αποδειχθεί ότι είναι σταθερή για ένα τουλάχιστον χρόνο, η συχνότητα των προσδιορισμών μπορεί να περιοριστεί και τα διαστήματα να αυξηθούν (π.χ. κάθε έξι μήνες).

1.6.6. **Διαλύματα δοκιμής**

Τα διαλύματα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση αρχικού πυκνού διαλύματος.

Το αρχικό διάλυμα θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανάδευση της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό αραίωσης με μηχανικά μέσα (π.χ. με μηχανική ανάδευση ή με υπερήχους). Για να επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση του αρχικού πυκνού διαλύματος είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες κορεσμού (στήλες διαλυτότητας). Πρέπει να αποφεύγεται, κατά το δυνατόν, η χρησιμοποίηση διαλυτών ή προσθέτων διασποράς (παραγόντων διαλυτοποίησης) εντούτοις, αυτές οι ουσίες είναι μερικές φορές απαραίτητες για την παρασκευή αρχικού πυκνού διαλύματος κατάλληλης συγκέντρωσης. Παραδείγματα κατάλληλων διαλυτών είναι η ακετόνη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, το *διμεθυλοφορμαμίδιο* και η τριαιθυλενογλυκόλη, ενώ κατάλληλα πρόσθετα διασποράς είναι το Cremop-hor RH40, το Tween 80, η μεθυλοκυτταρίνη 0,01 % και το HCO-40. Όταν χρησιμοποιούνται παράγοντες που βιοαποικοδομούνται εύκολα (π.χ. ακετόνη) ή/και παράγοντες υψηλής πτητικότητας, η χρήση τους θα πρέπει να γίνεται με προσοχή γιατί μπορεί να προκαλέσουν την ανάπτυξη βακτηρίων στις δοκιμασίες συνεχούς ροής. Όταν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης, αυτός δεν πρέπει να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην επιβίωση ούτε ορατές δυσμενείς επίπτώσης στα αρχικά στάδια της ζωής οπότε πρέπει να εκτελείται δοκιμασία ελέγχου με διαλύτη μόνο. Θα πρέπει πάντως να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια ώστε να αποφεύγεται η χρήση τέτοιων υλικών.

Για την ημιστατική τεχνική, είναι δυνατόν να ακολουθηθούν δύο διαφορετικές διαδικασίες ανανέωσης: είτε α) ετοιμάζονται νέα δοκιμαστικά διαλύματα σε καθαρά δοχεία και τα αβγά και οι προνύμφες (larvae) που έχουν επιβιώσει μεταφέρονται με ήπιο τρόπο στα νέα δοχεία εντός μικρού όγκου του παλαιού διαλύματος, χωρίς να εκτίθενται στον αέρα ή β) οι δοκιμαζόμενοι οργανισμοί διατηρούνται στα δοχεία ενώ αντικαθίσταται μέρος μόνο (τουλάχιστον τρία τέταρτα) του νερού. Η συχνότητα ανανέωσης του μέσου εξαρτάται από τη σταθερότητα της δοκιμαστικής ουσίας, συνιστάται πάντως καθημερινή ανανέωση του νερού. Εάν από προκαταρκτικές δοκιμασίες μελέτης της σταθερότητας (βλέπε 1.4) είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας δεν είναι σταθερή (βρίσκεται δηλαδή εκτός των ορίων 80-120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης ή κάτω από το 80 % της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης), σε όλη τη διάρκεια της ανανέωσης, πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο να χρησιμοποιηθεί δοκιμασία συνεχούς ροής. Σε κάθε περίπτωση, πρέπει να καταβληθεί προσπάθεια να αποφευχθεί το στρες στις προνύμφες κατά την διαδικασία ανανέωσης του νερού.

▼B

Στις δοκιμασίες συνεχούς ροής, για την προσαγωγή των διαλυμάτων στους δοκιμαστικούς θαλάμους απαιτείται σύστημα το οποίο να παρέχει συνεχώς και να αραιώνει ένα αρχικό διάλυμα της δοκιμαστικής ουσίας (π.χ. αντλία μετρήσεως, αναλογικός αραιωτής, σύστημα κορεσμού). Ο ρυθμός ροής των αρχικών διαλυμάτων και του νερού αραίωσης ελέγχεται κατά διαστήματα, κατά προτίμηση καθημερινά, και δεν διαφέρει περισσότερο από 10 % καθ όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας. Θεωρείται κατάλληλη μια ταχύτητα ροής ισοδύναμη με τον όγκο τουλάχιστον πέντε δοκιμαστικών θαλάμων ανά 24 ώρες (2).

1.7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία περιέχονται χρήσιμες πληροφορίες για την εκτέλεση των δοκιμασιών τοξικότητας στα έμβρυα ιχθύων και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry). Σχετικές παραπομπές υπάρχουν στις αναφορές (7) (8) (9) στη βιβλιογραφία του παρόντος.

1.7.1. **Συνθήκες έκθεσης**

1.7.1.1. *Διάρκεια*

Η δοκιμασία αρχίζει κατά προτίμηση εντός 30 λεπτών αφότου γονιμοποιηθούν τα αβγά. Τα έμβρυα ιχθύων εμβυθί-ζονται οτο δοκιμαστικό διάλυμα πριν αρχίσει το στάδιο της κυτταρικής διαίρεσης των βλαστοδίσκων ή αμέσως μετά, και πάντως προτού αρχίσει το στάδιο του γαστριδίου. Εάν τα αβγά προέρχονται από εξωτερικό προμηθευτή, είναι πιθανό να μην είνα δυνατό να ξεκινήσει η δοκιμασία αμέσως μετά τη γονιμοποίηση. Δεδομένου ότι η ευαισθησία της δοκιμασίας μπορεί να επηρεαστεί αισθητά από την καθυστέρηση έναρξης, η δοκιμασία πρέπει να ξεκινήσει εντός δώρου αφότου γίνει η γονιμοποίηση. Καθώς οι προνύμφες (larvae) δεν λαμβάνουν τροφή κατά την περίοδο έκθεσης, η δοκιμασία πρέπει να τελειώνει αμέσως πριν απορροφηθεί πλήρως ο λεκιθικός σάκος οποιασδήποτε προνύμφης (larvae) σε οποιοδήποτε από τους δοκιμαστικούς θαλάμους ή πριν σημειωθούν θάνατοι από ασιτία στους μάρτυρες. Η διάρκεια εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο είδος. Στα προσαρτήματα 2 και 3 προτείνονται χρόνοι για τη διάρκεια.

1.7.1.2. *Φορτίο*

Ο αριθμός γονιμοποιημένων αβγών στην αρχή της δοκιμασίας πρέπει να είναι στατιστικώς επαρκής. Τα αβγά κατανέμονται στις διάφορες ομάδες αγωγής με τυχαίο τρόπο, και χρησιμοποιούνται ανά συγκέντρωση τουλάχιστον 30 γονιμοποιημένα αβγά ισοκατανεμημένα (όσο είναι δυνατόν δεδομένου ότι για ορισμένα είδη είναι δύσκολο να ληφθούν ίσες παρτίδες) σε τρις τουλάχιστον όμοιους δοκιμαστικούς θαλάμους. Ο ρυθμός πλήρωσης (βιομάζα ανά όγκο δοκιμαστικού διαλύματος) πρέπει να είναι επαρκώς χαμηλός ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα (ASV) χωρίς αερισμό. Για τις δοκιμασίες συνεχούς ροής συνιστάται ο ρυθμός πλήρωσης να μην υπερβαίνει το 0,5 g/l ανά 24ωρο και να μην υπερβαίνει τα 5 g/l διαλύματος οποιαδήποτε στιγμή (2).

1.7.1.3. *Φως και θερμοκρασία*

Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού της δοκιμής θα πρέπει να ανταποκρίνονται στις ανάγκες του χρησιμοποιούμενου είδους ψαριών (προσαρτήματα 2 και 3). Για την παρακολούθηση της θερμοκρασίας, ενδείκνυται ίσως η χρήση ενός επιπλέον δοκιμαστικού δοχείου.

▼B

1.7.2. **Συγκεντρώσεις**

Κανονικά απαιτούνται 5 συγκεντρώσεις της δοκιμαστικής ουσίας οι οποίες να απέχουν μεταξύ τους κατά ένα σταθερό παράγοντα που δεν υπερβαίνει το 3,2. Η καμπύλη που συνδέει την LC_{50} με την περίοδο έκθεσης στη μελέτη οξείας τοξικότητας πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την επιλογή της σειράς συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία. Υπό ορισμένες συνθήκες, π.χ. στις οριακές δοκιμασίες, μπορεί να ενδείκνυται η χρήση λιγότερων από πέντε συγκεντρώσεων που θα απέχουν μάλιστα και λιγότερο μεταξύ τους. Εάν η δοκιμασία γίνει σε λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, θα πρέπει να δοθούν εξηγήσεις. Δεν χρειάζεται να δοκιμάζονται συγκεντρώσεις της ουσίας ανώτερες από την LC_{50} 96 ωρών ή από 100 mg/l όποια είναι χαμηλότερη Οι ουσίες δεν πρέπει να υποβάλλονται στη δοκηια- σία σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από το όριο διαλυτότητα τους στο νερό της δοκιμασίας.

Όταν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης για την παρασκευή των διαλυμάτων (βλέπε 1.6.6), η τελική του συγκέντρωση στα δοχεία δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,1 ml/1, η ίδια σε όλα τα δοχεία.

1.7.3. **Μάρτυρες**

Επιπλέον της κανονικής σειράς δοκιμασιών, πρέπει να γίνουν δοκιμασίες με σειρά μαρτύρων του νερού της δοκιμασίας (σε ικανοποιητικό αρι9μό επαναλήψεων) και, εφόσον έχει νόημα, με σειρά μαρτύρων που περιέχουν τον παράγοντα διαλυτοποίησης (σε ικανοποιητικό αριθμό επαναλήψεων).

1.7.4. **Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων**

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, οι συγκεντρώσεις της δοκιμαστικής ουσίας προσδιορίζονται σε τακτά διαστήματα.

Στις ημιστατικές δοκιμασίες όπου η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας αναμένεται να παραμένει εντός του ± 20 % της ονομαστικής (δηλαδή εντός των ορίων 80-120 %- βλέπε 1.4 και 1.6.6), συνιστάται να αναλύονται οι ελάχιστες και οι μέγιστες συγκεντρώσεις δοκιμής τουλάχιστον αμέσως μετά την παρασκευή τους και αμέσως πριν την ανανέωση του νερού και τουλάχιστον τρεις φορές σε τακτά διαστήματα κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (πρέπει δηλαδή να αναλύεται δείγμα του ίδιου διαλύματος αμέσως μετά την παρασκευή και αμέσως πριν την ανανέωσή του).

Όταν προβλέπεται ότι η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας δεν θα παραμείνει εντός του ± 20 % της ονομαστικής τιμής (με βάση τα στοιχεία για τη σταθερότητα της ουσίας), είναι απαραίτητο να αναλυθούν όλες οι συγκεντρώσεις, αμέσως μετά την παρασκευή και κατά την ανανέωση, με εφαρμογή όμως του ίδιου προγράμματος (δηλαδή τουλάχιστον τρεις φορές σε τακτά διαστήματα κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας). Σε όλες τις περιπτώσεις, ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της δοκιμαστικής ουσίας πριν την ανανέωση χρειάζεται να γίνεται σε ένα μόνο από τα όμοια δοχεία για κάθε συγκέντρωση. Το χρονικό διάστημα μεταξύ προσδιορισμών δεν πρέπει να υπερβαίνει τις επτά ημέρες. Συνιστάται να βασίζονται τα αποτελέσματα σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Εάν μπορεί να αποδειχτεί ότι η συγκέντρωση της δοκιμαστικής ουσίας καθ όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας διατηρήθηκε συνεχώς εντός του ± 20 % της ονομαστικής ή της αρχικώς μετρηθείσας συγκέντρωσης, τότε τα αποτελέσματα μπορούν να βασιστούν στις ονομαστικές ή τις αρχικώς μετρηθείσες τιμές.

Σε δοκιμασία συνεχούς ροής, ενδείκνυται καθεστώς δειγματοληψίας ανάλογο με το περιγραοόιιενο για ημιστατικές δοκιμασίες (στην περίπτωση όμως αυτή δεν ισχύουν οι μετρήσεις «παλαιών» διαλυμάτων). Εντούτοις, εάν η διάρκεια της δοκιμασίας υπερβαίνε; τις 7 ημέρες, καλό θα ήταν να αυξηθεί ο αριθμός των δειγματοληψιών στη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας (π.χ. τρεις σειρές μετρήσεων) ώστε να είναι βέβαιο ότι οι συγκεντρώσεις παραμένουν σταθερες,

▼B

Ίσως χρειάζεται να φυγοκεντρηθούν ή να διηθηθούν τα δείγματα (π.χ. με μέγεθος πόρου 0,45 μ). Ωστόσο, επειδή ούτε η διήθηση ούτε η φυγοκέντρηση φαίνεται να διαχωρίζουν πάντοτε το μη βιοδιαθέσιμο κλάσμα της δοκιμαστικής ουσίας από εκείνο που είναι βιοδιαθέσιμο, τα δείγματα μπορούν να μην υποβάλλονται σε αυτές τις κατεργασίες.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, σε όλα τα δοχεία θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις της συγκέντρωσης του δια-λελυμένου οξυγόνου, του ρΗ και της θερμοκρασίας. Στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο με την ανώτερη συγκέντρωση θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις της ολικής σκληρότητας και αλατότητας (εάν χρειάζεται). Το διαλελυμένο οξυγόνο και η αλατότητα (εφόσον χρειάζεται) θα πρέπει να μετρούνται τουλάχιστον τρεις φορές (στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της δοκιμασίας). Στις ημιστατικές δοκιμασίες, συνιστάται να εκτελούνται συχνότερες μετρήσεις του δια-λελυμένου οξυγόνου, κατά προτίμηση πριν και μετά από κάθε ανανέωση του νερού ή τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Το ρΗ πρέπει να μετρείται στην αρχή και στο τέλος κάθε ανανέωσης του νερού στην ημιστατική δοκιμασία και τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα στις δοκιμασίες συνεχούς ροής. Η σκληρότητα πρέπει να μετρείται μία φορά σε κάθε δοκιμασία. Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετρείται ημερησίως και κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα τουλάχιστον δοχείο.

1.7.5. **Παρατηρήσεις**

1.7.5.1. *Στάδιο εμβρυϊκής ανάπτυξης*

Το εμβρυϊκό στάδιο (π.χ. στάδιο ναστριδίου) στο οποίο βρίσκεται το υλικό στην αρχική φάση έκθεσης στη δοκιμαστική ουσία πρέπει να επαληθεύεται όσο το δυνατόν ακριβέστερα. Η επαλήθευση μπορεί να γίνει σε αντιπροσωπευτικό δείγμα αβγών τα οποία έχουν διατηρηθεί και καθαριστεί καταλλήλως. Είναι επίσης δυνατό να χρησιμοποιηθούν περιγραφές και απεικονίσεις των εμβρυϊκών σταδίων από τη βιβλιογραφία (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Εκκόλαψη και επιβίωση*

Η εκκόλαψη και η επιβίωση πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα και να καταγράφονται τα αριθμητικά δεδομένα. Είναι ενδεχομένως σκόπιμο να γίνονται συχνότερες παρατηρήσεις στην αρχή της δοκιμασίας (π.χ. κάθε 30 λεπτά κατά τις πρώτες τρις ώρες), καθώς σε ορισμένες περίπτώσης, οι χρόνοι επιβίωσης μπορεί να είναι πιο χρήσιμοι από τον αριθμό των θανάτων (π.χ. όταν υπάρχουν οξείες τοξικές επιπτώσεις). Τα νεκρά έμβρυα και οι προνύμφες (larvae) πρέπει να απομακρύνονται αμέσως μόλις υποβληθούν σε παρατήρηση δεδομένου ότι αποσυντίθεν-ται γρήγορα. Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή όταν απομακρύνονται τα νεκρά στοιχεία ώστε να μην χτυπηθούν ή υποστούν φυσική ζημιά τα γειτονικά αβγά/προνύμφες (larvae) καθώς είναι εξαιρετικά εύθραυστα και ευαίσθητα. Τα κριτήρια θανάτου είναι διαφορετικά αναλόγως του σταδίου ζωής:

— **για τα αβγά:** ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια, αισθητή μείωση διαφάνειας και αλλαγή χρώματος, λόγω πήξης ή/και καταβύθισης των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα λευκή θαμπή όψη,

— **για τα έμβρυα:** απουσία κίνησης του σώματος ή/και απουσία καρδιακού ρυθμού ή/και αποχρωματισμός και απώλεια διαφάνειας στα είδη των οποίων τα έμβρυα είναι κανονικά διαπερατά στο φως,

— **για τις προνύμφες (larvae):** ακινησία ή/και απώλεια αναπνευστικής κίνησης ή/και απουσία καρδιακού ρυθμού ή/και λευκό θαμπό χρώμα του κεντρικού νευρικού συστήματος ή/και έλλειψη αντίδρασης στα μηχανικά ερεθίσματα.

▼B

1.7.5.3. *Αφύσικη όψη*

Ο αριθμός προνυμφών (larvae) που εμφανίζουν αφύσικο σχήμα σώματος ή/και χρωματισμό κατά το στάδιο απορρόφησης του λεκιθικού σάκου θα πρέπει να καταγράφονται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα ανάλογα με τη διάρκεια της δοκιμασίας και το είδος της παρατηρούμενης ανωμαλίας. Πρέπει να σημειωθεί ότι ανώμαλα έμβρυα και προνύμφες (larvae) είναι φυσικό να εμφανίζονται και μπορεί να αντιπροσωπεύουν σημαντικό ποσοστό των μαρτύρων σε ορισμένα είδη. Τα ανώμαλα ζώα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοκιμαστικά δοχεία μόνο όταν πεθάνουν.

1.7.5.4. *Αφύσικη συμπεριφορά*

Οι ανωμαλίες, π.χ. υπεραερισμός, ασυντόνιστη κολύμβηση και ατυπική αταραξία πρέπει να καταγράφονται σε κατάλληλα διαστήματα αναλόγως της διάρκειας της δοκιμασίας. Λυτές οι επιπτώσεις, παρόλο που είναι δύσκολο να εκφραστούν ποσοτικά, μπορούν, όταν έχουν παρατηρηθεί, να βοηθήσουν στην ερμηνεία των δεδομένων θνησιμότητας π.χ. να παράσχουν πληροφορίες νια τον τρόπο τοξικής δράσης της ουσίας.

1.7.5.5. *Μήκος*

Στο τέλος της δοκιμασίας συνιστάται η μέτρηση του μήκους κάθε ψαριού χωριστά μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κανονικό μήκος, το μήκος έως τα πτερύγια ή το συνολικό μήκος. Εάν ωστόσο σημειωθεί αποσύνθεση του πτερυγίου της ουράς ή διάβρωση των πτερυγίων πρέπει να χρησιμοποιείται το κανονικό μήκος. Γενικά, όταν η δοκιμασία εκτελείται σωστά, ο συντελεστής απόκλισης του μήκους μεταξύ των επαναλήψεων των μαρτύρων πρέπει να είναι ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Βάρος*

Στο τέλος της δοκιμασίας μπορεί να μετρηθεί το βάρος κάθε ψαριού χωριστά το ξηρό βάρος (24 ώρες σε 60 °C) προτιμάται από το υγρό βάρος (μετά από στέγνωμα) Γενικά, όταν η δοκιμασία εκτελείται σωστά, ο συντελεστής απόκλισης του βάρους μεταξύ των επαναλήψεων των μαρτύρων πρέπει να είναι < 20 %.

Αυτές οι παρατηρήσεις 3α έχουν ως αποτέλεσμα να υπάρχουν διαθέσιμα για στατιστική ανάλυση τα ακόλουθα δεδομένα:

— συνολική θνησιμότητα,

— ρυθμός υγιών προνυμφών (larvae) στο τέλος της δοκιμασίας,

— χρόνος μεταξύ έναρξης της εκκόλαψης και λήξης της εκκόλαψης (δηλαδή εκκόλαψη κατά 90 % σε κάθε επαναληπτική ομάδα),

— αριθμός προνυμφών (larvae) που εκκολάπτονται κάθε μέρα,

— μήκος (και βάρος) των επιζώντων ζώων στο τέλος της δοκιμασίας,

— αριθμός παραμορφωμένων προνυμφών (larvae) ή που εμφανίζουν αφύσικη όψη,

— αριθμός προνυμφών (larvae) που εμφανίζουν αφύσικη συμπεριφορά.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Συνιστάται η συμμετοχή στατιστικολόγου στην εκτέλεση τόσο του σχεδιασμού όσο και της ανάλυσης της δοκιμασίας, επειδή η μέθοδος επιτρέπει σημαντικές διαφορές στον πειραματικό σχεδιασμό, π.χ. στον αριθμό των δοκιμαστικών θαλάμων, στον αριθμό των συγκεντρώσεων, στον αρχικό αριθμό γονιμοποιημένων αβγών και στις μετρούμενες παραμέτρους. Επειδή υπάρχουν πολλές επιλογές για τον σχεδιασμό της δοκιμασίας, δεν δίνονται εδώ ειδικές οδηγίες για τη στατιστική επεξεργασία.

Εάν πρέπει να υπολογιστούν οι τιμές LOEC/NOEC, θα είναι απαραίτητο να αναλυθούν οι διαφορές σε κάθε επαναληπτική ομάδα με ανάλυση διασποράς (ANOVA) ή πίνακα συσχετισμού. Για την εκτέλεση πολλαπλών συγκρίσεων μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφορετικών συγκεντρώσεων και των αποτελεσμάτων των μαρτύρων, ενδείκνυται ενδεχομένως η μέθοδος Dunnett (12) (13). Αλλα χρήσιμα παραδείγματα είναι επίσης διαθέσιμα, αναφορές (14) (15). Πρέπει να υπολογίζεται και να καταγράφεται ο βαθμός επίδρασης που μπορεί να εντοπιστεί μέσω ANOVA ή με άλλη διαδικασία (ήτοι η ισχύς της δοκιμασίας). Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είναι όλες οι παρατηρήσεις που αναφέρονται στο σημείο 1.7.5.6 κατάλληλες για στατιστική ανάλυση με ANOVA. Για παράδειγμα, η συνολική θνησιμότητα και ο αριθμός υγιών προνυμφών (larvae) στο τέλος της διαδικασίας α μπορούσαν να αναλυθούν με μεθόδους probit.

Εάν πρέπει να υπολογτστούν οι τιμές LC/EC_X, πρέπει να προσαρμόζονται τα δεδομένα που έχουν επιλεχθεί σε μία ή πολλές κατάλληλες καμπύλες, όπως η λογιστική καμπύλη, με στατιστική μέθοδο όπως των ελαχίστων τετραγώνων ή των μη γραμμικών ελαχίστων τετραγώνων. Η καμπύλη ή οι καμπύλες μπορούν να γίνουν παραμετρικές ώστε να είναι δυνατόν να προσδιοριστούν απευθείας η LC/EC_X και το τυπικό σφάλμα αυτής. Διευκολύνεται έτσι σε μεγάλο βαθμό ο υπολογισμός του ορίου εμπιστοσύνης της LC/EC_X. Καθορίζεται αμφίπλευρο επίπεδο εμπιστοσύνης 95 %, εκτός εάν υπάρχουν βάσιμοι λόγοι να καθοριστεί άλλο. Η διαδικασία προσαρμογής καλό είναι να παρέχει ένα μέσο ελέγχου της σημαντικότητας της έλλειψης προσαρμογής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί γραφική μέθοδος για την προσαρμογή των καμπυλών. Η αναγωγακή ανάλυση είναι κατάλληλη για όλες τις παρατηρήσεις που αναφέρονται στο σημείο 1.7.5.6.

2.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή αν οι μετρούμενες τοξικές συγκεντρώσεις των δοκιμαστικών διαλυμάτων βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων για συγκεντρώσεις πάνω απο την υδατοδιαλυτότητα της ουσίας πρέπει επίσης να γίνεται με προσοχή.

2.3. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.3.1. **Δοκιμαστική ουσία:**

— φυσικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες που αφορούν τη δοκιμασία

— χημικά χαρακτηριστικά, μεταξύ των οποίων η καθαρότητα και αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της εξεταζόμενης ουσίας, όπου απαιτείται.

▼B

2.3.2. **Είδος ψαριού που χρησιμοποιείται στη δοκιμή:**

— επιστημονική ονομασία, στέλεχος, αριθμός γεννητόρων (ήτοι πόσα θηλυκά χρησιμοποιήθηκαν για να ληφθεί ο απαιτούμενος αριθμός αβγών στη δοκιμασία), πηγή και μέθοδος συλλογής των γονιμοποιημένων αβγών και επακόλουθος χειρισμός.

2.3.3. **Συνθήκες εκτέλεσης της δοκιμασίας:**

— χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμασίας (π.χ. ημιστατική ή συνεχούς ροής, χρονικό διάστημα από τη γονιμοποίηση ως την έναρξη της δοκιμασίας, ρυθμός πλήρωσης, κ.λπ.),

— φωτοπερίοδος,

— σχεδιασμός της δοκιμασίας (π.χ. αριθμός δοκιμαστικών θαλάμων και αριθμός επαναλήψεων με την ίδια συγκέντρωση, αριθμός εμβρύων ανά επαναλαμβανόμενο δοχείο),

— μέθοδος παρασκευής των αρχικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (αναφέρονται, εφόσον χρησιμοποιούνται, ο παράγοντας διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του),

— οι ονομαστικές συγκεντρώσεις των δοκιμών, οι μετρηθείσες τιμές, οι μέσες τιμές των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοκιμαστικά δοχεία καθώς και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν και εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι διαλυτή στο νερό σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τις χρησιμοποιούμενες στη δοκιμασία, πρέπει να παρέχονται αποδεικτικά στοιχεία σύμφωνα με τα οποία οι μέτρήσης αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας που είναι διαλελυμένη,

— χαρακτηριστικά του νερού διάλυσης: ήτοι: ρΗ, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετρείται), ολικός οργανικός άνθρακας, αιωρούμενα στερεά, αλατότητα του δοκιμαστικού μέσου (εφόσον μετρείται) και τυχόν άλλες μετρήσεις,

— ποιότητα του νερού στα δοκιμαστικά δοχεία: πΗ, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου.

2.3.4. **Αποτελέσματα:**

— αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικών μελετών σχετικά με τη σταθερότητα της δοκιμαστικής ουσίας,

— στοιχεία ότι οι μάρτυρες πληρούν το πρότυπο αποδεκτής συνολικής επιβίωσης για το είδος ψαριού που χρησιμοποιείται στη δοκιμή (προσαρτήματα 2 και 3),

— στοιχεία για τη θνησιμότητα/επιβίωση στα στάδια του εμβρύου και της προνύμφης (larvae) και συνολική θνησιμότητα/επιβίωση,

— ημέρες εκκόλαψης και αριθμός εκκολαψθέντων αβγών,

— στοιχεία σχετικά με το μήκος (και το βάρος),

— συχνότητα εμφάνισης και περιγραφή μορφολογικών ανωμαλιών, εάν υπάρχουν,

— συχνότητα εμφάνισης και περιγραφή επιπτώσεων στη συμπεριφορά, εάν υπάρχουν,

— στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένω,

— για τις δοκιμασίες που αναλύονται με ANOVA, η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίπτωση (LOEC) σε p=0,05 και η συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίπτωση (NOEC) για κάθε απάντηση που αξιολογείται καθώς και περιγραφή των στατιστικών διαδικασιών που χρησιιιοποιήθηκαν και ενδεικτική αναφορά του ιιεγέθους των επιπτώσεων που μπορούν να ανιχνευθούν,

▼B

— λια τις δοκιμασίες που αναλύθηκαν με τεχνικές αναγωγής ο λόγος LC/EC_x και τα διαστήματα εμπιστοσύνης καθώς και γραφική παράσταση του μοντέλου προσέγγισης που χοησιμοποιήθηκε για τους σχετικούς υπολογισμούς,

— αιτολόγηση κάθε παρέκκλισης από τη μέθοδο της δοκιμασίας.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*BrachyiiamO rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout *(Salmo gairdneri)*. J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS l/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A.. Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Dartio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London. Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C. Deschamps F. and Roubaud P. (199 5). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicologv and Environmental Safetv 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias* latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias* latipes). EPA report EPA/600/3-91/06 3, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M, Cooney J. D., Mclntyre D. 0., Poccocic T. L, Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (198 5). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

Πίνακας 1Α

Είδη ψαριών συνιστώνται για τη δοκιμασία

ΓΛΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ
Oncorhynchus mykiss
Γραβανή (αμερικάνικη) πέστροφα (9) (16)
Danio rerio
Ζεβρόψαρο (7) (17) (18)
Cyprinus caprio
Κοινός κυπρίνος (σαζάνι) (8) (19)
Oryzias latipes
Γιαπωνέζικο ριζόψαρο/Medaka (20) (21)
Pimephaks promclas
Χοντροκέφαλη τσίμα (8) (22)

▼B

Πίνακας 1Β

Παραδείγματα άλλων ειδών για τα οποία υπάρχει επαρκής βιβλιογραφία και τα οποία έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί

Γλυκού νερού	Αλμυρού νερού
Carassius auratus Χρυσόψαρο (8) *Lepomis macrochirus* Γαλαζόσπλαχνο λεοτί (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23) (24) (25) *Clupea harengus* Ρέγγα (24) (25) *Gadus morhua* Βακαλάος (24) (25) *Cyprinodon vancgatus* πολύχρωμη τσίμα (23) (24) (25)

▼B

Προσαρτημα 1

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΕΚΙΘΟΦΟΡΑ ΙΧΘΥΔΙΑ (SAC-FRY) ΤΟΥ ΖΕΡΒΟΨΑΡΟΥ *(Brachydanio rerio)*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ζεβρόψαρο προέρχεται από την ακτή Coromandel της Ινδίας όπου κατοικεί στα υδατορεύματα ταχείας ροής. Πρόκειται για κοινό ψάρι ενυδρείου της οικογένειας των κυπρίνων. Πληροφορίες για τη φροντίδα και την καλλιέργεια του υπάρχουν στη βασική βιβλιογραφία για τα τροπικά ψάρια. Επιοκόπηση των σχετικών με τη βιολογία και την χρήση του στην ιχθυοτροφία ερευνών έχει δημοσιευθεί από τον Laale (1).

Το μήκος του σπανίως υπερβαίνει τα 45 mm. Το σώμα του είναι κυλινδρικό με 7-9 οριζόντιες σκούρες μπλε στιλπνές ραβδώσεις. Οι ραβδώσεις καταλήγουν στα πτερύγια της ουράς και της έδρας. Η ράχη είναι φαιοπράσινη. Τα αρσενικά είναι πιο αδύνατα από τα θηλυκά. Τα θηλυκά είναι πιο στιλπνά και η γαστρική χώρα είναι διεσταλμένη, ιδίως πριν την ωοτοκία.

Τα ενήλικα ψάρια είναι ικανά να ανεχθούν μεγάλες διακυμάνσεις θερμοκρασίας, pH και σκληρότητας. Ωστόσο, για να είναι τα ψάρια υγιή και να παράγουν αβγά καλής ποιότητας, πρέπει να εξασφαλίζονται βέλτιστες συνθήκες.

Κατά την ωοτοκία το αρσενικό ακολουθεί το θηλυκό και εφορμά, με αποτέλεσμα να γονιμοποιούνται τα αβγά αμέσως μόλις αποβληθούν. Τα αβγά, τα οποία είναι διαφανή και δεν είναι κολλώδη, πέφτουν στο βυθό και ενδεχομένως τρώγονται από τους γεννήτορες. Η ωοτοκία επηρεάζεται από το φως. Εάν το πρωινό φως είναι κατάλληλο, το ψάρι αποβάλλει το γόνο τις πρώτες πρωινές ώρες.

Το θηλυκό μπορεί να γεννήσει παρτίδες εκατοντάδων αβγών ανά εβδομάδα.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΓΕΝΝΗΤΟΡΕΣ, ΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΧΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΖΩΗΣ

Επιλέγεται κατάλληλος αριθμός υγιών ψαριών και αυτά κρατούνται σε κατάλληλα ύδατα (βλέπε προσάρτημα 4) για 2 τουλάχιστον εβδομάδες πριν την προβλεπόμενη ωοτοκία. Τα ψάρια θα πρέπει να έχουν ζευγαρώσει προς αναπαραγωγή μία τουλάχιστον φορά πριν παραχθεί η παρτίδα αβγών που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία. Η πυκνότητα των ψαριών κατά την περίοδο αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 γραμμάριο ψαριών ανά λίτρο. Τακτικές αλλαγές του νερού ή χρήση συστημάτων καθαρισμού είναι προϋποθέσεις υψηλότερης πυκνότητας. Η θερμοκρασία στις δεξαμενές δοχεία συντήρησης πρέπει να διατηρείται στους (25 ± 2 °C. Η τροφή των ψαριών πρέπει να ποικίλλει και να αποτελείται π.χ. από αποξηραμένη τροφή του εμπορίου, ζωντανά νεοεκκολαφθέντα αρτέμια (Arthemia), χιρονομίδες, Daphnia, λευκοσκώληκες (Enchytraeids).

Στη συνέχεια περιγράφονται συνοπτικά δύο διαδικασίες, οι οποίες στην πράξη έχουν οδηγήσει σε επαρκή παρτίδα γονιμοποιημένων αβγών για την εκτέλεση μιας δοκιμασίας.

i) Οκτώ θηλυκά και 16 αρσενικά τοποθετούνται σε δεξαμενή που περιέχει 50 λίτρα νερό αραίωσης και, χωρίς να εκτίθενται σε άμεσο φως, αφήνονται κατά το δυνατόν ανενόχλητα για 48 τουλάχιστον ώρες. Το απόγευμα της προηγούμενης μέρας, τοποθετείται στο βυθό του ενυδρείου δίσκος εναπόθεσης γόνου. Ο δίσκος αποτελείται από πλαίσιο (από πλεξιγκλάς ή άλλο κατάλληλο υλικό), ύψους 5-7 cm καλυμμένο στο επάνω μέρος με χονδρό δίχτυ 2-5 mm και στο κάτω μέρος με λεπτό δίχτυ 10-30 μm. Στο χονδρό δίχτυ του πλαισίου προσδένονται πολυάριθμα κομμάτια νάιλον σκοινιού ξετυλιγμένου τα οποία αποτελούν σημεία η'απύθέσης αβγών. Αφού αφεθούν στο σκοτάδι για 12 ώρες, τα ψάρια φωτίζονται με απαλό φως που αποτελεί έναυσμα για την εναπόθεση των αβγών. Δύο έως τέσσερις ώρες μετά την εναπόθεση των αβγών, αφαιρείται ο δίσκος και συλλέγονται τα αβγά. Ο δίσκος εμποδίζει τα ψάρια να φάνε τα αβγά και ταυτοχρόνως διευκολύνει τη συλλογή τους. Τα ψάρια πρέπει να έχουν γεννήσει τουλάχιστον μία φορά πριν γεννήσουν τα αβγά που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία.

▼B

ii) Πέντε έως 10 αρσενικά και θηλυκά ψάρια κρατούνται χωριστά τουλάχιστον 2 εβδομάδες πριν την προβλεπόμενη ωοτοκία. Μετά από 5-10 ημέρες, η γαστρική χώρα των θηλυκών διαστέλλεται και οι γπνητικές θηλές γίνονται ορατές. Τα αρσενικά δεν διαθέτουν θηλές. Η ωοτοκία γίνεται σε ειδικές δεξαμενές εξοπλισμένες με δικτυωτό ψευδοπάτο (όπως ανωτέρω). Η δεξαμενή γεμίζεται με νερό αραίωσης ώστε το βάθος του νερού πάνω από το δικτυωτό να είναι 5-10 cm. Ένα θηλυκό και δύο αρσενικά τοποθετούνται στη δεξαμενή την ημερα πριν την προβλεπόμενη ωοτοκία. Η θερμοκρασία του νερού αυξάνεται βαθμιαία ένα βαθμό πάνω από τη τη θερμοκρασία εγκλιματισμού. Η δεξαμενή αφήνεται στο σκοτάδι, κατά το δυνατόν χωρίς οχλήσεις. Το πρωί φωτίζεται με απαλό φως που αποτελεί έναυσμα για την εναπόθεση των αβγών. Μετά από 2-4 ώρες, αφαιρούνται τα ψάρια και συλλέγονται τα αβνά. Εάν χρειάζονται μεγαλύτερες παρτίδες αβγών από αυτές που μπορούν να παραχθούν από ένα θηλυκό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα όσες δεξαμενές αναπαραγωγής χρειάζονται. Καταγράφοντας το αναπαραγωγικό αποτέλεσμα καθενός από τα θηλυκά πριν τη δοκιμασία (μέγεθος παρτίδας και ποιότητα), μπορούν να επιλεχθούν για αναπαραγωγή τα θηλυκά με τις υψηλότερες αναπαραγωγικές επιδόσεις.

Τα αβγά μεταφέρονται στα δοκιμαστικά δοχεία με γυάλινες πιπέττες (εσωτερικής διαμέτρου όχι μικρότερης από 4 mm) εφοδιασμένες με ελαστική φούσκα αναρρόφησης. Η ποσότητα νερού που συνοδεύει τα αβγά κατά τη μεταφορά πρέπει να είναι όσο γίνεται μικρότερη αφού τα αβγά βυθίζονται στο νερό, βαρύτερα κα9ώς είναι, και μένουν έξω από την πιπέττα. Χρειάζεται προσοχή ώστε τα αβγά (και οι προνύμφες) να μην έρθουν σε επαφή με τον αέρα. Δείγμα της παρτίδας (ή δείγματα των παρτίδων) υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση για να εξασφαλιστεί ότι δεν εμφανίζονται ανωμαλίες στα πρώτα στάδια ανάπτυξης. Δεν επιτρέπεται η απολύμανση των αβγών.

Το ποσοστό θνησιμότητας των αβγών είναι υψηλότερο τις πρώτες 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Συχνά σημειώνεται θνησιμότητα 5-40 % σ' αυτό το διάστημα. Τα αβγά εκφυλίζονται λόγω ανεπιτυχούς γονιμοποίησης ή ατυχούς ανάπτυξης. Η ποιότητα της παρτίδας των αβγών φαίνεται να εξαρτάται από τα θηλυκά ψάρια καθώς μερικά θηλυκά παράγουν πάντοτε αβγά καλής ποιότητας, ενώ άλλα δεν τα καταφέρνουν ποτέ. Αλλά και ο ρυθμός ανάπτυξης και ο ρυθμός εκκόλαψης ποικίλλουν από τη μία παρτίδα στην άλλη. Τα επιτυχώς γονιμοποιημένα αβγά και οι προνύμφες (yolk sac larvae) σημειώνουν καλό ποσοστό επιβίωσης, συνήθως άνω του 90 %. Στους 25 °C τα αβγά εκκολάπτονται 3-5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση και ο λεκιθικός σάκος απορροφάται περίπου 13 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση.

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη έχει οριστεί ικανοποιητικά από τους Hisaoka και Battle (2). Λόγω της διαφάνειας των αβγών και των προνυμφών (post-hatch larvae) μετά την εκκόλαψη, είναι δυνατόν να παρακολουθείται η ανάπτυξη των ψαριών και να παρατηρείται η παρουσία δυσπλασιών. Περίπου τέσσερις ώρες μετά την ωοτοκία, τα μη γονιμοποιημένα αβγά διακρίνονται από τα γονιμοποιημένα (3). Για την εν λόγω εξέταση, τα αβγά και οι προνύμφες (larvae) τοποθετούνται σε δοκιμαστικά δοχεία μικρού όγκου και μελετώνται κάτω από το μικροσκόπιο.

Οι συνθήκες της δοκιμασίας που εφαρμόζονται στα αρχικά στάδια ζωής απαριθμούνται στο προσάρτημα 2. Οι βέλτιστες τιμές pH και σκληρότητας του ύδατος αραίωσης είναι 7,8 και 250 mg $CaCO_3$/l αντιστοίχως.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ

Προτείνεται προσέγγιση δύο σταδίων. Αρχικά αναλύονται στατιστικά τα στοιχεία για τη θνησιμότητα, τις ανωμαλίες ανάπτυξης και το χρόνο εκκόλαψης. Κατόπιν, για τις συγκεντρώσεις στις οποίες δεν έχουν ανιχνευθεί δυσμενείς επιπτώσεις σε καμία από αυτές τις παραμέτρους, αξιολογείται στατιστικά το μήκος του σώματος. Αυτή η προσέγγιση συνιστάται καθώς η τοξική ουσία μπορεί να επιφέρει επιλεκτικό θάνατο των μικρότερων ψαριών, παράταση του χρόνου εκκόλαψης και σοβαρές δυσπλασίες, και να οδηγήσει επομένως σε μη πραγματικά αποτελέσματα όσον αφορά τις μετρήσεις μήκους. Επιπλέον, ο αριθμός ψαριών προς μέτρηση του μήκους θα είναι περίπου ο ίδιος για κάθε αγωγή, οπότε εξασφαλίζεται η εγκυρότητα των στατιστικών δεδομένων.

▼B

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ LC_{50} ΚΑΙ EC_{50}

Το ποσοστό επιβίωσης των αβγών και των προνυμφών (larvae) υπολογίζεται και διορθώνεται βάσει της θνησιμότητας των μαρτύρων σύμφωνα με τον τύπο του Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

όπου:

P = διορθωμένο % επιβίωσης

P' = % παρατηρηθείσα επιβίωση στη συγκέντρωση δοκιμής

C = % επιβίωση στους μάρτυρες

Εάν είναι δυνατόν, η LC_{50} καθορίζεται με κατάλληλη μέθοδο στο τέλος της δοκιμασίας.

Για να συμπεριληφθούν στον στατιστικό υπολογισμό της EC_{50} και οι μορφολογικές ανωμαλίες, μπορεί να ανατρέξει κανείς στον Stephan (5).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ LOEC ΚΑΙ NOEC

Ένας από τους στόχους της δοκιμασίας στα αβγά και τα λεκιθοψόρα ιχθύδια (sac-fry) είναι να συγκριθούν οι μη μηδενικές συγκεντρώσεις με τις τιμές των μαρτύρων, δηλαδή να προσδιοριστεί η LOEC. Επομένως πρέπει να χρησιμοποιηθούν διαδικασίες πολλαπλής σύγκρισης (6) (7) (8) (9) (10).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Laale H. W. (19"). The Biology and Use of the Zebrafish *(Bradndanio* rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121-173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beirn Zebrabarbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766,). G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Προσαρτημα 2

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΟΚΙΜΑΓΙΑΣ, ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΕΙΔΗ

Είοη	Θερμοκρυσία (T)	Λλατόυμα (0/00)	Φωτοπερίοδοσς (ώρες)	Διάρκεια των σταδίων (ημέρες)		Τυπική διάρκεια δοκιμασίας	Επιβίωση μαρτύρων (ελάχιστη %)	
				Έμβρυα	Δοκιμασία σε λεκιθοφόρα (sac-fry]		Επιτυχία εκκόλαψης	Μετά την εκκόλαψη
ΓΛΥΚΛ ΝΕΡΑ								
Brachydanio rerio Ζεβρόψαρο	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 5 ημέρες μετά την εκκόλαψη (8-10 ημέρες)	80	90
Oncorhynchus mykiss	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (3)	30-35	25-30	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 20 ημέρες μετά την εκκόλαψη (50-5 5 ημέρες)	66	70
Γραβανή (αμερικανική) πέστροφα	21-25	—	12-16	5	> 4	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (8-9 ημέρες)	80	75
C*yprinus carpio* Κυπρίνος (σαξάνι)	24 + 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 5 ημέρες μετά την εκκόλαψη (13-16 ημέρες)	80	80
Oryzias latipes Γιαπωνέζικο piιξόψαρο/medaka *Pimephales promelas* Χοντροκεφαλη τσίμα	25 + 2		16	4-5	5	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (8-9 ημέρες)	60	70

(1) Για έμβρυα.
(2) Για προνύμφες.
(3) Σκοτάδι για τα έμβρυα και τις προνύμφες έως μία εβδομάδα μειά την εκκόλαψη εκτός εάν επιθεωρούνται. Κατόπιν χαμηλό φως καθ όλη τη δοκιμασία.

Προσαρτημα 3

Συνθήκες Δοκιμής, Διάρκεια Και Κριτήρια Επιβιώσης Για Τα Είδη Για Τα Οποία Υπάρχει Επαρκής Βιβλιογραφία

Είδη	Θερμοκρασια (T)	Αλατότητα (0/00)	Φωτοπερίοδος (ώρες)	Διάρκεια των σταδίων (ημέρες)		Τυπική διάρκεια δοκιμασίας στα έμβρυα και τα λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry)	Επιβίωση των μαρτύρων (ελάχιστη %)	
				Έμβρυα	Δοκιμασία σε λεκιθοφόρα ιχθύδια (sac-fry)		Επιτυχία της εκκόλαψης	Μετά την εκκόλαψη
ΓΛΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ								
Carassius auratus Χρυσόψαρο	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση {αρχικό στάδιο γαστριδίοιι) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (7 ημέρες)	—	80
l.eopomis macrochiru Blugill sunfish	21 ± 1	—	16	3	> 4	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη (7 ημέρες)	—	75
ΛΛΜΥΡΟΥ ΝΕΡΟΥ								
Menidia peninsulac Tidewater silveiside	22-25	15-22	12	1,5	10	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 5 ημέρες μετά την εκκόλαψη (6-7 ημέρες)	80	60
Clupea harengu Ρέγγα	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 3 ημέρες μετά την εκκόλαψη (23-27 ημέρες)	60	80
Gadus morhua Βακαλάος	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γαστριδίου) έως 3 ημέρες μετά την εκκόλαψη (18 ημέρες)	60	80
Cyprinodon variegatus Πολύχρωμη τοίμα	25 ± 1	15-30	12	—	—	Το συντομότερο δυνατό μετά τη γονιμοποίηση (αρχικό στάδιο γασιμιδίου) έως 4/7 ημέρες μετά την εκκόλαψη (28 ημέρες)	> 75	80

▼B

ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ 4

ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΟΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΥΔΑΤΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Ουσία	Συγκεντρώσεις
Αιωρούμενα σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 ug/l
Υπολειμματικό χλώριο	< 1 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	< 50 mg/1
Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα συν πολυχλωριούχα διφαινύλια	< 50 ng/1
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/1

▼B

Γ.16. ΜΕΛΙΣΣΕΣ —ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ— ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η εν λόγω μέθοδος μελέτης οξείας τοξικότητας αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 213 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόκειται για μια εργαστηριακή μέθοδο προβλεπόμενη για τη μελέτη της οξείας τοξικότητας που παρατηρείται σε ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών ως αποτέλεσμα της λήψεως φυτοπροστατευτικών προϊόντων και άλλων χημικών ουσιών από το στόμα.

Κατά την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας ουσίας, ενδέχεται να χρειαστεί να προσδιοριστεί η οξεία τοξικότητα ως αποτέλεσμα της λήψεως από το στόμα σε περιπτώσεις π.χ. κατά τις οποίες θεωρείται πιθανή η έκθεση μελισσών σε συγκεκριμένη χημική ουσία. Η υπόψη μελέτη πραγματοποιείται για να προσδιοριστεί η εγγενής τοξικότητα φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών στις μέλισσες. Με βάση τα αποτελέσματα θα κριθεί κατά πόσον χρειάζεται να γίνει περαιτέρω αξιολόγηση. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κλιμακωτά προγράμματα αξιολόγησης των κινδύνων που διατρέχουν οι μέλισσες από τα φυτοφάρμακα, με βάση τη συνεχή εξέλιξη των εργαστηριακών δοκιμών τοξικότητας σε πειράματα ημιπεδίου και πεδίου (1). Τα φυτοφάρμακα μπορούν να δοκιμάζονται ως δραστικές ουσίες ή ως παρασκευάσματα.

Για τη διαπίστωση της ευαισθησίας των μελισσών και της ακρίβειας της διαδικασίας χρησιμοποιείται πρότυπη τοξική ουσία.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Οξεία τοξικότητα ως αποτέλεσμα λήψεως από το στόμα: είναι οι βλαβερές συνέπειες που εμφανίζονται το αργότερο μέσα σε 96 ώρες αφότου χορηγηθεί από το στόμα μία δόση της δοκιμαζόμενης ουσίας.

Δόση: είναι η αναλισκόμενη ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκφράζεται σε μάζα (μg) δοκιμαζόμενης ουσίας ανά πειραματόζωο (μg/μέλισσα). Καθώς οι μέλισσες εκτρέφονται ομαδικά, δεν μπορεί να υπολογιστεί η πραγματική δόση ανά μέλισσα, αλλά υπολογίζεται κατ εκτίμηση μια μέση δόση (συνολική αναλωθείσα ποσότητα/αριθμός μελισσών ανά κλωβό).

LD_{50} (μέση θανατηφόρα δόση) από το στόμα: είναι η στατιστικώς προκύπτουσα δόση ουσίας, η οποία, χορηγούμενη από το στόμα, μπορεί να προκαλεσα το θάνατο σε ποσοστό 50 % των ζώων. Η τιμή LD_{50} εκφράζεται σε μg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα. Προκειμένου για φυτοφάρμακα, η δοκιμαζόμενη ουσία μπορεί να είναι είτε δραστική ουσία είτε παρασκεύασμα περιέχον μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες.

Θνησιμότητα: το ζώο καταγράφεται ως νεκρό όταν είναι εντελώς ακίνητο.

1.3. ΑΓΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών (Apis *mellifera)* εκτίθενται σε μια σειρά δόσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας μέσα σε διάλυμα σακχαρόζης. Στη συνέχεια, τους παρέχεται η ίδια τροφή, ελεύθερη όμως της δοκιμαζόμενης ουσίας. Καταγράφεται η θνησιμότητα σε καθημερινή βάση επί 48 τουλάχιστον ώρες, και γίνεται σύγκριση με τις τιμές που καταγράφονται στους μάρτυρες. Εάν το ποσοστό θνησιμότητας αυξάνεται ανάμεσα στις 24 και τις 48 ώρες ενώ η θνησιμότητα των μαρτύρων παραμένει σε αποδεκτά επίπεδα, δηλαδή $\leq$ 10 %, ενδείκνυται παράταση της δοκιμασίας μέχρι το πολύ 96 ώρες. Τα αποτελέσματα αναλύονται για να υπολογιστεί η LD_{50} μετά παρέλευση 24 ωρών και 48 ωρών και, σε περίπτωση παράτασης της δοκιμασίας, μετά παρέλευση 72 ωρών και 96 ωρών.

▼B

1.4. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμασίας είναι οι ακόλουθες:

— ο μέσος όρος θνησιμότητας επί του συνολικού αριθμού των μαρτύρων να μην υπερβαίνει ποσοστό 10 % στο τέλος της δοκιμασίας,

— η LD_{50} της πρότυπης τοξικής ουσίας να βρίσκεται μέσα στην καθορισμένη περιοχή τιμών.

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.5.1. **Πώς επιλέγονται οι μέλισσες**

Χρησιμοποιούντα; νεαρά ενήλικα άτομα ερνατριών μελισσών, δηλαδή μέλισσες της ίδιας ηλικίας διαιτητικής αγωγής, φυλής κ.λπ., προερχόμενες απο υνιείς αποικίες με βασίλισσα, επαρκώς τρεφόμενες, κατά το δυνατόν χωρίς ασθένειες, τέλος δε με φυσιολογία και ιστορικό γνωστά. Οι μέλισσες επιλέγονται το πρωί της ίδιας ημέρας κατά την οποία θα γίνει η δοκιμασία ή το βράδυ της προηγούμενης και φυλάσσονται στις συνθήκες της δοκιμασίας μέχρι την επομένη. Μέλισσες συλλεγόμενες από πλαίσια χωρίς μελισσόπουλα είναι κατάλληλες. Η συλλογή μελισσών νωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο πρέπει να αποφεύγεται γιατί, τότε η φυσιολογία τους παρουσιάζει μεταβολές. Εάν πρέπει να γίνουν δοκιμασίες νωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο, οι μέλισσες τοποθετούνται σε εκκολαπτήριο και ως τροφή τούς παρέχεται επί μία εβδομάδα «bee bread» (γύρη από την κηρήθρα) και διάλυμα σακχαρόζης. Μέλισσες που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με χημικές ουσίες, όπως π.χ. αντιβιοτικά, προϊόντα anti-varroa κ.λπ., δεν χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες μελέτης τοξικότητας επί τέσσερεις εβδομάδες μετά τη λήξη της τελευταίας αγωγής.

1.5.2. **Στέγη και τροφή**

Οι χρησιμοποιούμενοι κλωβοί θα πρέπει να είναι ευάεροι και να καθαρίζονται εύκολα. Οι κλωβοί μπορεί να είναι π.χ. από ανοξείδωτο χάλυβα, συρματόπλεγμα ή πλαστικό ή ακόμη να είναι ξύλινοι κλωβοί μιας χρήσεως κ.λπ. Προτιμώνται ομάδες δέκα μελισσών ανά κλωβό. Το μέγεθος των κλωβών για τις δοκιμασίες θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να υπάρχει αρκετός χώρος για όλες τις μέλισσες.

Οι μέλισσες φυλάσσονται στον χώρο του πειράματος, που θα πρέπει να είναι σκοτεινός και να έχει θερμοκρασία (25 ± 2 ºC Καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας καταγράφεται η σχετική υγρασία, που κανονικά πρέπει να κυμαίνεται από 50 έως 70 %. Οι διάφοροι χειρισμοί (συμπεριλαμβάνονται παροχή τροφής και παρατηρήσεις) μπορούν να γίνονται στο φως της ημέρας. Ως τροφή χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα σακχαρόζης με τελική συγκέντρωση 500 g/l (50 % κ.ό.). Μετά τη χορήγηση των δόσεων δοκιμασίας, παρέχεται τροφή κατά βούληση *(ad* libitum). Η ταΐστρα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να είναι δυνατή η καταγραφή της προσλαμβανόμενης τροφής για κάθε κλωβό (βλέπε 1.6.3.1). Ως τέτοια μπορεί να χρησιμοποιηθεί γυάλινος σωλήνας μήκους 50 mm και πλάτους 10 mm, που θα στενεύει στο ανοιχτό άκρο και θα έχει διάμετρο 2 mm.

1.5.3. **Προετοιμασία των μελισσών**

Οι μέλισσες τοποθετούνται τυχαίως στους κλωβούς, οι οποίοι με τη σειρά τους τοποθετούνται επίσης τυχαίως στο δωμάτιο του πειράματος.

▼B

Δύο ώρες προτού αρχίσει η δοκιμασία, οι μέλισσες μπορούν να μείνουν χωρίς τροφή. Συνιστάται η μη χορήγηση τροφής πριν τη δοκιμασία, ώστε κατά την έναρξη όλες οι μέλισσες να βρίσκονται στην ίδια κατάσταση ως προς το περιεχόμενο του πεπτικού σωλήνα. Προτού αρχίσει η δοκιμασία, εκβάλλονται οι ετοιμοθάνατες μέλισσες και αντικαθίστανται από υγιείς.

1.5.4. **Παρασκευή των δοκιμαστικών διαλυμάτων**

Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία είναι υδατοδιαλυτή, προστίθεται απευθείας σε διάλυμα σακχαρόζης 50 %. Για προϊόντα χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν έκδοχα (π.χ. οργανικοί διαλύτες, γαλακτωματοποιητές ή πρόσθετα διασποράς) χαμηλής τοξικότητας για τις μέλισσες (π.χ. ακετόνη, διμεθυλοφορμαμίδιο, διμεθυλοσουλφοξεί-διο). Η συγκέντρωση του εκδόχου εξαρτάται από τη διαλυτότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας και πρέπει να είναι η ίδια για κάθε συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εντούτοις, συγκέντρωση του εκδόχου ίση με 1 % είναι κατά κανόνα κατάλληλη και δεν χρειάζεται μεγαλύτερη.

Απαιτούνται κατάλληλα διαλύματα για τους μάρτυρες όταν δηλαδή χρησιμοποιείται διαλύτης ή πρόσθετο διασποράς για τη διαλυτοποίηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο χωριστές ομάδες μαρτύρων: η μία θα εκτεθεί σε υδατικό διάλυμα και η άλλη σε διάλυμα σακχαρόζης με το διαλύτη στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στα διαλύματα με την εκάστοτε δόση της δοκιμαζόμενης ουσίας (δοκιμαστικά διαλύματα).

1.6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.6.1. **Ομάδες υπό δοκιμασία και ομάδες μάρτυρες**

Ο αριθμός των δόσεων και των επαναλήψεων της δοκιμασίας για κάθε δόση θα πρέπει να ανταποκρίνονται στις στατιστικές απαιτήσεις για προσδιορισμό της τιμής LD_{50} με όριο εμπιστοσύνης 95 56. Απαιτούνται κανονικά για τη δοκιμασία πέντε συγκεντρώσεις που θα διαφέρουν η μία από την άλλη κατά συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 2,2 και που θα καλύπτουν την περιοχή τιμών LD_{50}. Εντούτοις, ο συντελεστής αραίωσης και ο αριθμός δόσεων πρέπει να προσδιορίζονται σε σχέση με την κλίση της καμπύλης τοξικότητας (δόση/θνησιμότητα) και με συνεκτίμηση της στατιστικής μεθόδου βάσει της οποίας θα γίνει ανάλυση των αποτελεσμάτων. Μια δοκιμασία εντοπισυού εύρους τιμών εξυπηρετεί την επιλογή των κατάλληλων δόσεων.

Η δοκιμασία γίνεται με τρεις τουλάχιστον όμοιες ομάδες, δέκα μελισσών η καθεμιά, για την κάθε συγκέντρωση (δόση). Επιπλέον δοκιμάζονται τρεις τουλάχιστον ομάδες μαρτύρων, δέκα μελισσών η καθεμιά. Ομάδες μαρτύρων πρέπει επίσης να προβλεφθούν για τους χρησιμοποιούμενους διαλύτες/φορείς (βλέπε 1.5.4).

1.6.2. **Πρότυπη τοξική ουσία**

Στις δοκιμασίες πρέπει να συμπεριληφθεί μια πρότυπη τοξική ουσία και να επιλεγούν τρεις τουλάχιστον δόσεις ώστε να καλυφθούν οι αναμενόμενες τιμές LD_{50}. Για κάθε δόση χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον κλωβοί με δέκα μέλισσες ο καθένας. Ως πρότυπη τοξική ουσία προτιμάται ο διμεθοϊκός εστέρας, για τον οποίο καταγράφονται τιμές LD_{50}-24 h στην περιοχή τιμών 0,10-0,35 μg δραστικής ουσίας ανά μέλισσα (2). Μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιηθούν κι άλλες πρότυπες τοξικές ουσίες (π.χ. παραθείο) όταν υπάρχουν επαρκή δεδομένα προς επαλήθευση της αναμενόμενης απόκρισης στην εκάστοτε δόση.

▼B

1.6.3. **Έκθεση**

1.6.3.1. *Χορήγηση των δόσεων*

Κάθε δοκιμαζόμενη ομάδα μελισσών εκτίθεται σε 100-200 μl υδατικού διαλύματος σακχαρόζης 50 %, το οποίο περιέχει τη δοκιμαζόμενη ουσία στην κατάλληλη συγκέντρωση. Για προϊόντα χαμηλής διαλυτότητας, χαμηλής τοξικότητας ή χαμηλής συγκέντρωσης μέσα στο παρασκεύασμα απαιτείται μεγαλύτερος όγκος, αφού θα χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες αναλογίες στο διάλυμα σακχαρόζης. Παρακολουθείται η ποσότητα τροφής (διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία) που καταναλώνει η κάθε ομάδα. Μετά παρέλευση 3-4 ωρών (οπότε έχει κατά κανόνα καταναλωθεί η τροφή), αφαιρείται η ταΐστρα από τον κλωβό και αντικαθίσταται με άλλη που περιέχει σκέτο διάλυμα σακχαρόζης, το οποίο και προσφέρεται κατά βούληση (ad libitum). Η απόρριψη της τροφής σε περιπτώσεις μεγαλύτερων συγκεντρώσεων ορισμένων ουσιών ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα μηδενική ή ελάχιστη απορρόφηση τροφής. Μετά παρέλευση 6 το πολύ ωρών, η μη καταναλωθείσα τροφή πρέπει να α\τικατασταθεί με σκέτο διάλυμα σακχαρόζης. Υπολογίζεται η καταναλωθείσα ποσότητα τροφής (π.χ. μετρείται ο όγκος ή το βάρος του εναπομένοντος διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία).

1.6.3.2. *Διάρκεια*

Η δοκιμασία διαρκεί κατά προτίμηση 48 ώρες. Εάν μετά τις πρώτες 24 ώρες η θνησιμότητα εξακολουθεί να αυξάνει κατά περισσότερο από 10 %, η διάρκεια της δοκιμασίας παρατείνεται μέχρι το πολύ 96 ώρες υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα των μαρτύρων δεν υπερβαίνει ποσοστό 10 %.

1.6.4. **Παρατηρήσεις**

Η θνησιμότητα καταγράφεται αφού περάσουν 4 ώρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας και στη συνέχεια μετά παρέλευση 24 ώρες και 48 ώρες (εννοείται μετά τη χορήγηση της εκάστοτε δόσης). Εάν χρειαστεί να παραταθεί η διάρκεια των παρατηρήσεων, πρέπει να συνεχιστούν οι αξιολόγησης ανά 24 ώρες, μέχρι το πολύ 96 ώρες υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα των μαρτύρων δεν υπερβαίνει ποσοστό 10 %.

Υπολογίζεται η ποσότητα τροφής που κατανάλωσε κάθε ομάδα. Από τη σύγκριση των ρυθμών πρόσληψης τροφής με ή χωρίς τη δοκιμαζόμενη ουσία μέσα σε χρόνο 6 ώρες, μπορούν να προκύψουν συμπεράσματα για το κατά πόσον προσλαμβάνεται ευχάριστα η τροφή που περιέχει τη δοκιμαζόμενη ουσία.

Καταγράφεται κάθε είδους αφύσικη συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

1.6.5. **Οριακή δοκιμασία**

Σε ορισμένες περιπτώσεις (όταν για παράδειγμα μια δοκιμαζόμενη ουσία αναμένεται να είναι χαμηλής τοξικότητας), ενδέχεται να πραγματοποιηθεί μια οριακή δοκιμασία, με τη χρησιμοποίηση 100 μg δραστικής ουσίας ανά μέλισσα για να αποδειχτεί ότι η τιμή της LD_{50} είναι μεγαλύτερη από την τιμή αυτή. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται σε τρεις όμοιες ομάδες για την εκάστοτε δόση, τους αντίστοιχους μάρτυρες, τον υπολογισμό της καταναλωθείσας ποσότητας διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία, τέλος δε για την πρότυπη τοξική ουσία. Εάν σημειωθούν θάνατοι, θα πρέπει να γίνει πλήρης μελέτη. Εάν παρατηρηθούν επιπτώσεις σχεδόν θανατηφόρες (βλέπε 1.6.4), πρέπει να καταγραφούν.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ**

2.1 ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφαίνονται, για κάθε ομάδα που εκτίθεται στη δοκιμαζόμενη ουσία, καθώς και για τις ομάδες των μαρτύρων και τις ομάδες που εκτίθενται στην πρότυπη τοξική ουσία, ο αριθμός των χρησιμοποιηθεισών μελισσών, η θνησιμότητα ανά χρονικό διάστημα παρατήρησης και ο αριθμός μελισσών με αφύσικη συμπεριφορά. Τα δεδομένα τα σχετικά με τη θνησιμότητα αναλύονται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους (π.χ. ανάλυση probit, κινητός μέσος, διωνυμική πιθανότητα) (3) (4). Χαράσσονται καμπύλες δόσης-απόκριοης για κάθε συνιστώμενη χρονική διάρκεια παρατήρησης και υπολογίζονται οι κλίσης των καμπυλών και οι μέσες θανατηφόρες δόσεις (LD_{50}) με όριο εμπιστοσύνης 95 %. Με τη βοήθεια της διόρθωσης Abbott (4) (5), μπορούν να γίνουν διορθώσεις της θνησιμότητας των μαρτύρων. Όταν δεν καταναλωθεί πλήρως το διάλυμα με τη δοκιμαζόμενη ουσία, πρέπει να προσδιοριστεί η δόση της ανά ομάδα καταναλωθείσας δοκιμαζόμενης ουσίας. Η $ΛΔ_{50}$ πρέπει να εκφράζεται σε μg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα.

2.2. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1. **Δοκιμαζόμενη ουσία:**

— φυσικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες που αφορούν τη δοκιμασία (π.χ. σταθερότητα στο νερό, τάση ατμών).

— χημικά χαρακτηριστικά, μεταξύ των οποίων συντακτικός τύπος, καθαρότητα (προκείμενου να φυτοφαρμακα. ταυτότητα και συγκέντρωση των δραστικών ουσιών).

2.2.2. **Χρησιμοποιηθέν είδος:**

— επιστημονικό όνομα, φυλή. ηλικία κατά προσέγγιση (σε εβδομάδες), τρόπος και ημερομηνία συλλογής,

— πληροφορίες για τις αποικίες μελισσών από τις οποίες προέρχονται οι μέλισσες που χρησιμοποιήθηκαν για την υπόψη μελέτη (υγεία, τυχόν ασθένειες στα ενήλικα άτομα, τυχόν προηγούμενη αγωγή κ.λπ.).

2.2.3. **Συνθήκες της δοκιμασίας:**

— θερμοκρασία και σχετική υγρασία του πειραματικού χώρου,

— τύπος, μέγεθος και υλικό των κλωβών,

— μέθοδοι παρασκευής του πυκνού διαλύματος και των δοκιμαστικών διαλυμάτων (εάν χρησιμοποιηθεί διαλύτης αναφέρεται υποχρεωτικά, καθώς και η συγκέντρωση αυτού),

— περιγραφή της δοκιμασίας σε γενικές γραμμές (πόσες και ποιες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός μαρτύρων, αριθμός κλωβών και μελισσών ανά κλωβό για κάθε συγκέντρωση και ομάδα μαρτύρων),

— ημερομηνία της δοκιμασίας.

▼B

2.2.4. **Αποτελέσματα:**

— αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικής μελέτης ε\τοπισμού εύρους τιμών,

— ακατέργαστα δεδομένα: θνησιμότητα για κάθε δόση και χρονική διάρκεια παρατήρησης,

— γραφικές παράστασης δόσης-απόκρισης στο τέλος της δοκιμασίας,

— τιμές LD_{50} με όριο εμπιστοσύνης 95 % για κάθε χρονική διάρκεια παρατήρησης, ουσία και πρότυπη τοξική ουσία,

— στατιστικές μέθοδοι προσδιορισμού της LD_{50},

— θνησιμότητα κατά τους ελέγχους,

— άλλες παρατηρήσεις ή μετρήσεις βιολογικών επιπτώσεων όπως π.χ. αφύσικη συμπεριφορά των μελισσών (συμπεριλαμβάνεται η απόρριψη της δόσης), ρυθμός πρόσληψης τροφής αναλόγως εάν περιέχει ή όχι τη δοκιμαζόμενη ουσία,

— τυχόν παρέκκλιση από τις περιγραφόμενες εδώ διαδικασίες της δοκιμασίας και κάθε άλλη σχετική πληροφορία.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.l, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., Mclndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis *mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon. F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

Γ.17. ΜΕΛΙΣΣΕΣ — ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΑΦΗ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η εν λόγω μέθοδος μελέτης οξείας τοξικότητας αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 214 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόκειται για μια εργαστηριακή μέθοδο προβλεπόμενη για τη μελέτη της οξείας τοξικότητας που παρατηρείται σε ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών ως αποτέλεσμα της επαφής με φυτοπροστατευτικά προϊόντα και άλλα χημικές ουσίες.

Κατά την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας ουσίας, ενδέχεται να χρειαστεί να προσδιοριστεί η οξεία τοξικότητα που προκαλείται με την επαφή σε περιπτώσεις π.χ. κατά τις οποίες θεωρείται πιθανή η έκθεση μελισσών σε συγκεκριμένη χημική ουσία. Η υπόψη μελέτη πραγματοποιείται για να προσδιοριστεί η εγγενής τοξικότητα φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών στις μέλισσες. Με βάση τα αποτελέσματα θα κριθεί κατά πόσον χρειάζεται να γίνει περαιτέρω αξιολόγηση. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κλιμακωτά προγράμματα αξιολόγησης των κινδύνων που διατρέχουν οι μέλισσες από τα φυτοφάρμακα, με βάση τη συνεχή εξέλιξη των εργαστηριακών δοκιμών τοξικότητας σε πειράματα ημιπεδίου και πεδίου (1). Τα φυτοφάρμακα μπορούν να δοκιμάζονται ως δραστικές ουσίες ή ως παρασκευάσματα.

Για τη διαπίστωση της ευαισθησίας των μελισσών και της ακρίβειας της διαδικασίας χρησιμοποιείται πρότυπη τοξική ουσία.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Οξεία τοξικότητα που προκαλείται με την επαφή: είναι οι βλαβερές συνέπειες που εμφανίζονται το αργότερο μέσα σε 96 ώρες αφότου εφαρμοστεί τοπικά μία δόση της δοκιμαζόμενης ουσίας.

Δόση: είναι η εφαρμοζόμενη ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκφράζεται σε μάζα (μg) δοκιμαζόμενης ουσίας ανά πειραματόζωο (μg/μέλισσα)

LD_{50} (μέση θανατηφόρα δόση) με την επαφή: είναι η στατιστικώς προκύπτουσα δόση ουσίας, η οποία μπορεί με την επαφή να προκαλέσει τον θάνατο σε ποσοστό 50 % των ζώων. Η τιμή LD_{50} εκφράζεται σε μg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα. Προκειμένου για φυτοφάρμακα, η δοκιμαζόμενη ουσία μπορεί να είναι είτε δραστική ουσία είτε παρασκεύασμα περιέχον μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες.

Θνησιμότητα: ζώο καταγράφεται ως νεκρό όταν είναι εντελώς ακίνητο.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ενήλικα άτομα εργατριών μελισσών (Apis *mellifera)* εκτίθενται σε μια σειρά δόσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας δια-λελυμένης σε κατάλληλο φορέα, με άμεση εφαρμογή σταγονιδίων στον θώρακα. Η διάρκεια της δοκιμασίας είναι 48 ώρες. Εάν το ποσοστό θνησιμότητας αυξάνεται ανάμεσα στις 24 και τις 48 ώρες ενώ η θνησιμότητα των μαρτύρων παραμένει σε αποδεκτά επίπεδα, δηλαδή < 10 %, ενδείκνυται παράταση της δοκιμασίας μέχρι το πολύ 96 ώρες. Τα αποτελέσματα αναλύονται για να υπολογιστεί η LD_{50} μετά παρέλευση 24 ώρών και 48 ώρών και, σε περίπτωση παράτασης της δοκιμασίας, μετά παρέλευση 72 ώρών και 96 ώρών.

▼B

1.4. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμασίας είναι οι ακόλουθες:

— ο μέσος όρος θνησιμότητας επί του συνόλου των μαρτύρων να μην υπερβαίνει ποσοστό 10 % στο τέλος της δοκιμασίας,

— η LD_{50} της πρότυπης τοξικής ουσίας να βρίσκεται μέσα στην καθορισμένη περιοχή τιμών.

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.5.1. **Πώς επιλέγονται οι μέλισσες**

Χρησιμοποιούνται νεαρά ενήλικα άτομα εργατῦῖών μελισσών, δηλαδή μέλισσες της ίδιας ηλικίας, διαιτητικής αγωγής, φυλής κ.λπ., προερχόμενες από υγιείς αποικίες με βασίλισσα, επαρκώς τρεφόμενες, κατά το δυνατόν χωρίς ασθένειες. τέλος δε με φυσιολογία και ιστορικο γνωστα. Οι μέλισσες επιλενονται το πρωί της ίδιας ημέρας κατά την οποία θα γίνει η δοκιμασία ή το βράδυ της προηγούμενης και φυλάσσονται στις συνθήκες της δοκιμασίας μέχρι την επομένη. Μέλισσες συλλεγόμενες από πλαίσια χωρίς μελισσόπουλα είναι κατάλληλες. Η συλλογή μελισσών νωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο πρέπει να αποφεύγεται γιατί, τότε η φυσιολογία τους παρουσιάζει μεταβολές. Εάν πρέπει να γίνουν δοκιμασίες νωρίς την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο, οι μέλισσες τοποθετούνται σε εκκολαπτήριο και ως τροφή τούς παρέχεται επί μία εβδομάδα «bee bread» (γύρη από την κηρήθρα) και διάλυμα σακχαρόζης. Μέλισσες που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με χημικές ουσίες, όπως π.χ. αντιβιοτικά, προϊόντα anti-varroa κ.λπ., δεν χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες μελέτης τοξικότητας επί τέσσερεις εβδομάδες μετά τη λήξη της τελευταίας αγωγής.

1.5.2. **Στέγη και τροφή**

Οι χρησιμοποιούμενοι κλωβοί 9α πρέπει να είναι ευάεροι και να καθαρίζονται εύκολα. Οι κλωβοί μπορεί να είναι π.χ. από ανοξείδωτο χάλυβα, συρματόπλεγμα ή πλαστικό ή ακόμη να είναι ξύλινοι κλωβοί μιας χρήσεως κ.λπ. Προτιμώνται ομάδες δέκα μελισσών ανά κλωβό. Το μέγεθος των κλωβών για τις δοκιμασίες θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να υπάρχει αρκετός χώρος για όλες τις μέλισσες.

Οι μέλισσες φυλάσσονται στον χώρο του πειράματος, που θα πρέπει να είναι σκοτεινός και να έχει θερμοκρασία 25 ± 2 °C. Καθ όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας καταγράφεται η σχετική υγρασία, που κανονικά πρέπει να κυμαίνεται από 50 έως 70 %. Οι διάφοροι χειρισμοί (συμπεριλαμβάνονται παροχή τροφής και παρατηρήσεις) μπορούν να γίνονται στο φως της ημέρας. Ως τροφή χρησιμοποιείται υδαπκό διάλυμα σακχαρόζης με τελική συγκέντρωση 500 g/l (50 % κ.ό) και παρέχεται κατά βούληση (ad libitum) κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας με τη βοήθεια ειδικής ταΐστρας μελισσών. Ως τέτοια μπορεί να χρησιμοποιηθεί γυάλινος σωλήνας μήκους 50 mm και πλάτους 10 mm, που θα στενεύει στο ανοιχτό άκρο και θα έχει διάμετρο 2 mm.

1.5.3. **Προετοιμασία των μελισσών**

Οι μέλισσες αναισθητοποιούνται με διοξείδιο του άνθρακα ή με άζωτο, ώστε να είναι δυνατή η τοπική εφαρμογή της δοκιμαζόμενης ουσίας. Η χρησιμοποιούμενη ποσότητα αναισθητικού και ο χρόνος έκθεσης πρέπει να είναι τα ελάχιστα δυνατά. Προτού άρχισα η δοκιμασία, εκβάλλονται οι ετοιμοθάνατες μέλισσες και αντικαθίστανται από υγιείς.

1.5.4. **Παρασκευή των δοκιμαστικών διαλυμάτων**

Η δοκιμαζόμενη ουσία εφαρμόζεται υπό μορφή διαλύματος μέσα σε κατάλληλο φορέα, δηλαδή σε οργανικό διαλύτη ή σε υδατικό διάλυμα με αντιδραστήριο διαβροχής. Ως οργανικός διαλύτης προτιμάται η ακετόνη, μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν κι άλλοι διαλύτες (π.χ. διμεθυλοφορμαμίδιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο). Προκειμένου για υδατοδιαλυτά παρασκευάσματα και οργανικές ενώσεις αδιάλυτες σε οργανικούς διαλύτες, τα διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας καλό είναι, για ευκολότερη εφαρμογή τους, να ετοιμάζονται μέσα σε ασθενές διάλυμα ενός αντιδραστηρίου διαβροχής του εμπορίου (π.χ. Agral, Gttowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Απαιτούνται κατάλληλα διαλύματα για τους μάρτυρες όταν δηλαδή χρησιμοποιείται διαλύτης ή πρόσθετο διασποράς για τη διαλυτοποίηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο χωριστές ομάδες μαρτύρων η μία θα εκτεθεί σε υδατικό διάλυμα και η άλλη σε διάλυμα που θα περιέχει διαλύτη/πρόσθετο διασποράς.

1.6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.6.1. **Ομάδες υπό δοκιμασία και ομάδες μάρτυρες**

Ο αριθμός των δόσεων και των επαναλήψεων της δοκιμασίας για κάθε δόση θα πρέπει να ανταποκρίνονται στις στατιστικές απαιτήσεις για προσδιορισμό της τιμής LD_{50} με όριο εμπιστοσύνης 95 %. Απαιτούνται κανονικά για τη δοκιμασία πέντε συγκεντρώσεις που θα διαφέρουν η μία από την άλλη κατά συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 2,2 και που θα καλύπτουν την περιοχή τιμών LD_{50}. Εντούτοις, ο αριθμός των δόσεων πρέπει να προσδιορίζεται σε σχέση με την κλίση της καμπύλης τοξικότητας (δόση/θνησιμότητα) και με συνεκτίμηση της στατιστικής μεθόδου βάσει της οποίας θα γίνει ανάλυση των αποτελεσμάτων. Μια δοκιμασία εντοπισμού εύρους τιμών εξυπηρετεί την επιλογή των κατάλληλων δόσεων.

Η δοκιμασία γίνεται με τρεις τουλάχιστον όμοιες ομάδες, δέκα μελισσών η καθεμιά, για την κάθε συγκέντρωση (δόση).

Επιπλέον δοκιμάζο\ται τρεις τουλάχιστον ομάδες μαρτύρων, δέκα μελισσών η καθεμιά. Εάν χρησιμοποιηθεί οργανικός διαλύτης ή α\τιδραστήριο διαβροχής, πρέπει να προβλεφθούν τρεις επιπλέον ομάδες μαρτύρων δέκα μελισσών η καθεμιά για τον διαλύτη ή το αχτιδραστήριο διαβροχής.

1.6.2. **Πρότυπη τοξική ουσία**

Στις δοκιμασίες πρέπει να συμπεριληφθεί μια πρότυπη τοξική ουσία και να επιλεγούν τρεις τουλάχιστον δόσεις ώστε να καλυφθούν οι αναμενόμενες τιμές LD_{50}. Για κάθε δόση χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον κλωβοί με δέκα μέλισσες ο καθένας. Ως πρότυπη τοξική ουσία προτιμάται ο διμεθο'ικός εσπέρας, για τον οποίο καταγράφο\ται τιμές LD_{50}-24 ώρες στην περιοχή τιμών 0,10 - 0,35 μg δραστικής ουσίας ανά μέλισσα (2). Μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιηθούν κι άλλες πρότυπες τοξικές ουσίες (π.χ. παραθείο) όταν υπάρχουν επαρκή δεδομένα προς επαλήθευση της αναμενόμενης απόκρισης στην εκάστοτε δόση.

1.6.3. **Έκθεση**

1.6.3.1. *Χορήδηση δόσεων*

Η τοπική εφαρμογή του διαλύματος γίνεται χωριστά σε καθεμιά από τις αναισθητοποιημένες μέλισσες. Η επιλογή των μελισσών για τις διάφορες δόσεις και ελέγχους γίνεται τυχαία. Στη ραχιαία πλευρά της θωρακικής χώρας εφαρμόζεται με τη βοήθεια ειδικής μικροδιάταξης 1 μl διαλύματος με τη δοκιμαζόμενη ουσία στην κατάλληλη συγκέντρωση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν κι άλλοι όγκοι, αυτό όμως πρέπει να αιτιολογηθεί. Μετά την εφαρμογή, οι μέλισσες τοποθετούνται μέσα σε κλωβούς όπου υπάρχουν διαλύματα γλυκόζης.

1.6.3.2. *Διάρκεια*

Η δοκιμασία διαρκεί κατά προτίμηση 48 ώρες. Εάν στο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τις 24 μέχρι τις 48 ώρες η θνησιμότητα αυξηθεί κατά περισσότερο από 10 %, η διάρκεια της δοκιμασίας παρατείνεται μέχρι το πολύ.96 ώρες, υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα ελέγχου δεν υπερβαίνει ποσοστό 10 %.

▼B

1.6.4. **Παρατηρήσεις**

Η θνησιμότητα καταγράφεται μετά παρέλευση 4, 24 και 48 ωρών από τη χορήγηση της εκάστοτε δόσης. Εάν χρειαστεί να παραταθεί η διάρκεια των παρατηρήσεων, πρέπει να συνεχιστούν οι αξιολογήσεις ανά 24 ώρες, μέχρι το πολύ 96 ώρες, υπό τον όρο ότι η θνησιμότητα των μαρτύρων δεν υπερβαίνει ποσοστό 10 %.

Καταγράφεται κάθε είδους αφύσικη συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

1.6.5. **Οριακή δοκιμασία**

Σε ορισμένες περιπτώσεις (όταν για παράδειγμα μια δοκιμαζόμενη ουσία αναμένεται να είναι χαμηλής τοξικότητας), ενδέχεται να πραγματοποιηθεί μια οριακή δοκιμασία, με τη χρησιμοποίηση 100 ug δραστικής ουσίας ανά μέλισσα για να αποδειχτεί ότι η τιμή της LD_{50} είναι μεγαλύτερη από την τιμή αυτή. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται σε τρεις όμοιες ομάδες για την εκάστοτε δόση, τους αντίστοιχους μάρτυρες και την πρότυπη τοξική ουσία. Εάν σημειωθούν θάνατοι, θα πρέπει να γίνει πλήρης μελέτη. Εάν παρατηρηθούν επιπτώσεις σχεδόν θανατηφόρες (βλέπε 1.6.4), πρέπει να καταγραφούν.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ**

2.1. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφαίνονται, για κάθε ομάδα που εκτίθεται στη δοκιμαζόμενη ουσία, καθώς και για τις ομάδες των μαρτύρων και τις ομάδες που εκτίθενται στην πρότυπη τοξική ουσία, ο αριθμός των χρησιμοποιηθεισών μελισσών, η θνησιμότητα ανά χρονικό διάστημα παρατήρησης και ο αριθμός μελισσών με αφύσικη συμπεριφορά. Τα δεδομένα τα σχετικά με τη θνησιμότητα αναλύονται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους (π.χ. ανάλυση probit, κινητός μέσος, διωνυμική πιθανότητα) (3) (4). Χαράσσονται καμπύλες δόσης-απόκρισης για κάθε συνιστώμενη χρονική διάρκεια παρατήρησης (24 και 48 ωρών, ενδεχομένως δε 72 και 96 ωρών) και υπολογίζονται οι κλίσεις των καμπυλών και οι μέσες θανατηφόρες δόσεις (LD_{50}) με όριο εμπιστοσύνης 95 %. Με τη βοήθεια της διόρθωσης Abbott (4) (5), μπορούν να γίνουν διορθώσεις της θνησιμότητας των μαρτύρων. Η LD_{50} πρέπει να εκφράζεται σε μg δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μέλισσα.

2.2. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1. **Δοκιμαζόμενη ουσία:**

— φυσικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. σταθερότητα στο νερό, τάση ατμών),

— χημικά χαρακτηριστικά, αεταξύ των οποίων συντακτικός τύπος, καθαρότητα (προκειμένου για φυτοφάρμακα, ταυτότητα και συγκέντρωση των δραστικών ουσιών)

2.2.2. **Χρησιμοποιηθέν είδος:**

— επιστημονικό όνομα, φυλή, ηλικία κατά προσέγγιση (σε εβδομάδες), τρόπος και ημερομηνία συλλογής.

— πληροφορίες για τις αποικίες από τις οποίες προέρχονται οι μέλισσες που χρησιαοποιήθηκαν στην υπόψη μελέτη (υγεία, τυχόν ασθένειες στα ενήλικα άτομα, τυχόν προηγούμενη αγωγή. κλπ.).

▼B

2.2.3. **Συνθήκες της δοκιμασίας:**

— θερμοκρασία και σχετική υγραοία του πειραματικού χώρου,

— τύπος, μέγεθος και υλικό των κλωβών,

— πληροφορίες σχετικές με τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας (π.χ. διαλύτης/φορέας, όγκος διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για τοπική εφαρμογή, αναισθητικό),

— περιγραφή της δοκιμασίας σε γενικές γραμμές (πόσες και ποιες δόσεις χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός μαρτύρων, αριθμός κλωβών και μελισσών ανά κλωβό για κάθε δόση και ομάδα μαρτύρων),

— ημερομηνία της δοκιμασίας.

2.2.4. **Αποτελέσματα:**

— αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικής μελέτης εντοπισμού εύρους τιμών,

— ακατέργαστα δεδομένα: θνησιμότητα για κάθε δόση και χρονική διάρκεια παρατήρησης,

— γραφικές παραστάσεις δόσης-απόκρισης στο τέλος της δοκιμασίας,

— τιμές LD_{50} με όριο εμπιστοσύνης 95 % για κάθε χρονική διάρκεια παρατήρησης, ουσία και πρότυπη τοξική ουσία,

— στατιστικές μέθοδοι προσδιορισμού της LD_{50},

— θνησιμότητα κατά τους ελέγχους,

— άλλες παρατηρήσεις ή μετρήσεις βιολογικών επιπτώσεων και κάθε αφύσικη συμπεριφορά των μελισσών,

— τυχόν παρέκκλιση από τις περιγραφόμενες εδώ διαδικασίες της δοκιμασίας και κάθε άλλη σχετική πληροφορία.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.l, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., Mclndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis *mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

Γ.18. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ/ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΚΑΤΑ ΠΑΡΤΙΔΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 106, για τον προσδιορισμό της προσρόφησης/'εκρόφησης εδαφών με μέθοδο ισορροπίας κατά παρτίδα (2000).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη μέθοδο ελήφθη υπόψη κυκλική δοκιμή και συνάντηση ανταλλαγής απόψεων σχετικά με την επιλογή εδαφών για την ανάπτυξη δοκιμής προσρόφησης (1) (2) (3) (4) καθώς επίσης και υφιστάμενες κατευθυντήριες γραμμές σε εθνικό επίπεδο (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Οι μελέτες προσρόφησης/εκρόφησης είναι χρήσιμες για τη λήψη βασικών πληροφοριών για την κινητικότητα των χημικών ουσιών και την κατανομή τους στο έδαφος, το νερό και τα αέρια στρώματα της βιόσφαιρας (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Οι πληροφορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρόβλεψη ή εκτίμηση, π.χ., της διαθεσιμότητας μιας χημικής ουσίας προς αποικοδόμηση (22) (23), μετασχηματισμό και πρόσληψη της από οργανισμούς (24), της απόπλυσής της διαμέσου των εδαφικών στρωμάτων (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), της πτητικότητας της από το έδαφος (21) (29) (30) και της απορροής της από χερσαίες επιφάνειες σε φυσικά ύδατα (18) (31) (32). Τα δεδομένα προσρόφησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για συγκριτικούς και προτυποποιητικούς σκοπούς (19) (3 3) (34) (35).

Η κατανομή μιας χημικής ουσίας μεταξύ εδάφους και υδατικών φάσεων αποτελεί μία πολύπλοκη διεργασία που εξαρτάται από διάφορους παράγοντες: τη χημική φύση της ουσίας (12) (36) (37) (38) (39) (40), τα χαρακτηριστικά του εδάφους (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) και κλιματικούς παράγοντες όπως οι βροχοπτώσεις, η θερμοκρασία, το φως του ήλιου και ο άνεμος. Έτσι, τα πολυάριθμα φαινόμενα και μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διεργασία της προσρόφησης μιας χημικής ουσίας στο έδαφος δεν μπορούν vu οριστούν πλήρως από ένα απλοποιημένο εργαστηριακό μοντέλο όπως η παρούσα μέθοδος. Εντούτοις, έστω κι αν η παρούσα προσπάθεια δεν μπορεί να καλύψει όλες τις περιβαλλοντικώς πιθανές περιπτώσεις, προσφέρει επαρκείς πληροφορίες για τη σημασία σε σχέση με το περιβάλλον της προσρόφησης μιας χημικής ουσίας.

D/νεπε επίσης γενική εισαγωγή.

1.2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η μέθοδος αποσκοπεί στην εκτίμηση της συμπεριφοράς μιας χημικής ουσίας από πλευράς προσρόφησης/εκρόφησης στο έδαφος. Στόχος είναι να ληφθεί μία τιμή ρόφησης που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην πρόβλεψη της κατανομής σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίζονται συντελεστές προσρόφησης σε ισορροπία για μια χημική ουσία σε διάφορα εδάφη σε συνάρτηση με τα εδαφικά χαρακτηριστικά (π.χ. περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, περιεκτικότητα σε άργιλο και υφή και το pH του εδάφους). Για να καλυφθούν όσο το δυνατό καλύτερα οι αλληλεπιδράσεις μιας δεδομένης ουσίας με φυσικώς απαντώμενα εδάφη, πρέπει να χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι εδαφών.

Στην παρούσα μέθοδο, η προσρόφηση αντιπροσωπεύει τη διεργασία της σύνδεσης μιας χημικής ουσίας με επιφάνειες εδαφών. Δεν γίνεται διάκριση μεταξύ διαφορετικών διεργασιών προσρόφησης (φυσική και χημική προσρόφηση) και διεργασιών όπως η επιφανειακώς καταλυόμενη αποικοδόμηση, η κατά μάζα προσρόφηση ή η χημική αντίδραση. Προσρόφηση η οποία απαντάται σε κολλοειδή σωματίδια (διάμετρος < 0,2 μm) δημιουργούμενα από το έδαφος δεν λαμβάνεται υπόψη.

▼B

Οι εδαφικές παράμετροι που πιστεύεται ότι παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην προσρόφηση είναι: η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), η περιεκτικότητα σε άργιλο και η υφή του εδάφους (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) και το pH για τις ιονιξόμενες ενώσεις (3) (4) (42). Αλλες εδαφικές παράμετροι οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την προσρόφηση/εκρόφηση μιας συγκεκριμένης ουσίας είναι η ενεργός κατιοανταλλακτική ικανότητα (ECEC), η περιεκτικότητα σε άμορφα οξείδια σιδήρου και αργϋνλίου, ιδιαίτερα για ηφαιστειακά και τροπικά εδάφη (4), καθώς επίσης και η ειδική επιφάνεια (49).

Η δοκιμή έχει σχεδιαστεί για την εκτίμηση της προσρόφησης μιας χημικής ουσίας σε διάφορους τύπους εδαφών με ποικίλη περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, άργιλο και εδαφική υφή και pH. Περιλαμβάνει τρία μέρη:

Μέρος 1: Προκαταρκτική μελέτη για να προσδιοριστούν:

— ο λόγος εδάφους/διαλύιιατος,

— ο χρόνος ισορροπίας για την προσρόφηση και η προσροφημένη ουσία κατά την ισορροπία,

— η προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων και η σταθερότητα της κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Μέρος 2: Δοκιμή προσανατολισμού: μελετάται η προσρόφηση σε πότε διαφορετικούς τύπους εδαφών μέσω της κινητικής της προσροφήσεως σε μία μόνή συγκέντρωση και προσδιορισμού των συντελεστών κατανομής K_c και

Μέρος 3: Προσδιορισμός των ισόθέρμων προσρόφησης Freundlich για τον προσδιορισμό της επίδρασης της συγκέντρωσης στην έκταση της προσρόφησης στα εδάφη.

Μελέτη της εκρόφησης μέσω της κινητικής εκρόφησης/ισο3έρμων εκρόφησης Freundlich (προσάρτημα 1).

1.3. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Σύμβολο	Ορισμός	Μονάδες
A_{t_i}	ποσοστιαία προσρόφηση τη χρονική στιγμή t_i	%
A_{eq}	ποσοστιαία προσρόφηση στην κατάσταση ισορροπίας	%
$m_s^{ads}(t_i)$	μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας τη χρονική στιγμή t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	μάζα της προσροφουμένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας στην κατάσταση ισορροπίας	μg
m_0	μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο δοκιμαστικό σωλήνα στην αρχή της δοκιμής προσρόφησης	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	μάζα της υπό δοκίμή ουσίας ανευρισκόμενη σε ποσότητα (v_a^A) τη χρονική στιγμή t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	μάζα της ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης	μg
m_{soil}	ποσότητα της εδαφικής φάσης, εκφραζόμενη σε ξηρή μάζα εδάφους	g

▼B

Σύμβολο	Ορισμός	Μονάδες
C_{st}	κ.ό. συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος της ουσίας	μg cm^{-3}
C_0	αρχική κ.ό. συγκέντρωση του υπό δοκιμή διαλύματος σε επαφή με το έδαφος	μg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	κ.ό. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση τη χρονική στιγμή t_i της ανάλυσης	μg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	συγκέντρωση της προσροφημένης ουσίας στο έδαφος στην κατάσταση ισορροπίας	μg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	κ.ό. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης	μg cm^{-3}
V_o	αρχικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος κατά τη διάρκεια της δοκιμής προσρόφησης	cm^3
v_a^A	όγκος της ποσότητας στην οποία μετράται η υπό δοκιμή ουσία	cm^3
K_d	συντελεστής κατανομής για την προσρόφηση	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	τυποποιημένος συντελεστής προσρόφησης οργανικού άνθρακα	cm^3 g^{-1}
K_{om}	τυποποιημένος συντελεστής κατανομής οργανικής ύλης	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	συντελεστής προσρόφησης Freundlich	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}g^{-1}$
1/n	εκθέτης Freundlich	
D_{t_i}	ποσοστιαία εκρόφηση τη χρονική στιγμή t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	ποσοστιαία εκρόφηση κατά το χρονικό διάστημα Δt_i	%
K_{des}	φαινομενικός συντελεστής εκρόφησης	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	συντελεστής εκρόφησης Freundlich	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}g^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	μαζα της εκροφημένης από το έδαφος υπό δοκιυη ουσίας κατά το χρόνο τ_i	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που εκροφάται από το έδαφος κατά τη διάρκεια του χρόνου Δ_{ti}	μg
$m_m^{des}(eq)$	μάζα της ουσίας που προσδιορίζεται αναλυτικώς στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	συνολική μάζα της εκροφημένης υπό δοκιμή ουσίας σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	μάζα της ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος μετά τη χρονική περίοδο Δt_i	μg
m_{aq}^A	μάζα της ουσίας που περισσεύει μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης λόγω μη πλήρους κατ' όγκο αντικατάστασης	μg
$C_s^{des}(eq)$	συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος στην κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	μg g^{-1}

▼B

Σύμβολο	Ορισμός	Μονάδες
$C_{aq}^{des}(eq)$	κ.ό. συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	μg cm^{-3}
V_T	συνολικός όγκος της σε επαφή με το έδαφος υδατικής φάσης κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής της εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά μέθοδο	cm^3
V_R	όγκος του υπερκειμένου υγρού που απομακρύνεται από το σωλήνα μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται από ίσο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	όγκος της ποσότητας που δειγματίζεται για αναλυτικούς σκοπούς από τη χρονική στιγμή (i), κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά δοκιμή	cm^3
V_t^i	όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα (i) για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε πείραμα κινητικής εκρόφησης (παράλληλη μέθοδος)	cm^3
V_r^F	όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης	cm^3
MB	υπόλοιπο μάζας	%
m_E	συνολική μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που εκχυλίζεται από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοχείου δοκιμής σε δύο στάδια	μg
V_{rec}	όγκος του υπερκειμένου υγρού που ανακτάται μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης (cm^3)	cm^{-3}
P_{OW}	συντελεστής κατανομής σε οκτανόλη/νερό	
pKa	σταθερά διαστάσεως	
S_W	υδατοδιαλυτότητα	gl^{-1}

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Γνωστοί όγκοι διαλυμάτων της υπό δοκιμή ουσίας, ραδιοϊχνηθετημένης ή μη, σε γνωστές συγκεντρώσεις σε 0,01 M $CaCl_2$ προστίθενται σε δείγματα εδαφών γνωστού ζηρού βάρους που έχουν προηγουμένως σταθεροποιηθεί σε 0,01 M $CaCl_2$. Το μείγμα αναδεύεται για κατάλληλο χρονικό διάστημα. Τα εδαφικά εναιωρήματα διαχωρίζονται κατόπιν με φυγοκέντρηση και, εφόσον επιθυμείται, διήθηση και η υδατική φάση αναλύεται. Η ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας που προσροφάτα; στο εδαφικό δείγμα υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ της ποσότητας της υπό δοκιμή ουσίας που υπήρχε αρχικά στο διάλυμα και της ποσότητας που παραμένει στο τέλος του πειράματος (έμμεση μέθοδος).

Εναλλακτικώς, η ποσότητα της προσροφουμενης υπό δοκιμή ουσίας μπορεί επίσης να προσδιοριστεί απευθείας με ανάλυση του εδάφους (άμεση μέθοδος). Η διαδικασία αυτή, η οποία συνίσταται σε σταδιακή εκχύλιση του εδάφους με κατάλληλο διαλύτη, συνιστάται σε περιπτώσεις όπου η διαφορά στη συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα δεν μπορεί να προσδιοριστεί επακριβώς. Παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι: προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνεια των δοκιμαστικών σωλήνων, αστάθεια της υπό δοκιμή ουσίας στη χρονική κλίμακα του πειράματος. ασθενής προσρόφηση που επιφέρει μικρές μονο μεταβολές συγκητρώσεως στο διάλυμα και ισχυρή προσρόφηση που απολήγει σε χαμηλή συγκέντρωση που δεν μπορεί να προσδιοριστεί επακριβώς. Εφόσον χρησιμοποιείται ραδιοίχνηθε-τημένη ουσία, η εκχύλιση του εδάφους μπορεί να αποφευχθεί με ανάλυση της εδαφικής φάσης μέσω καύσης και καταμέτρησης υγρού σπινθηρισμού. Εντούτοις, η καταμέτρηση υγρού σπινθηρισμού είναι μία μη εξειδικευμένη τεχνική που δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ αρχικών και προϊόντων μετασχηματισμού. Συνεπώς, 9α πρέπει να χρησιμοποιείται μόνον εφόσον η υπό δοκιμή ουσία είναι σταθερή κατά τη διάρκεια της μελέτης.

▼B

1.5. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια θα πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας. Συνιστάται η χρήση μη ιχνηθετημένων υπό δοκιμή ουσιών με γνωστή σύσταση και, κατά προτίμηση, 95 % τουλάχιστον βαθμό καθαρότητας ή ραδιοϊχνηθε-τημένων υπό δοκιμή ουσιών με γνωστή σύσταση και ραδιοκαθαρότητα. Στην περίπτωση ιχνηθετών βραχείας ημιζωής, θα πρέπει να γίνονται διορθώσεις σχετικά με τη διάσπαση.

Πριν από την εκτέλεση μιας δοκιμής προσρόφησης-εκρόφησης, θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα τα ακόλουθα στοιχεία για την υπό δοκιμή ουσία:

α) υδατοδιαλυτότητα (Α.6)·

β) τάση ατμών (Α.4) ή/και σταθερά του νόμου του Henry

γ) αβιοτική αποικοδόμηση: υδρόλυση σε συνάρτηση με το pH (Γ. 7)·

δ) συντελεστής κατανομής (Α.8)-

ε) άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (C.4) ή αερόβιος και αναερόβιος μετασχηματισμός στο έδαφος·

στ) pKa ιοντίσιμων ουσιών·

ξ) άμεση φωτόλυση στο νερό (δηλαδή φάσμα απορρόφησης UV-ορατού στο νερό, κβαντοαπόδοση) και φωτοαποι-κοδόμηση στο έδαφος.

1.6. ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η δοκιμή μπορεί να εφαρμοστεί σε χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχει αναλυτική μέθοδος με επαρκή ορθότητα (accuracy). Μία σημαντική παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, ειδικά όταν ακολουθείται η έμμεση μέθοδος, είναι η σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στη χρονοκλίμακα της δοκιμής. Έτσι, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της σταθερότητας με μια προκαταρκτική δοκιμή. Εφόσον παρατηρηθεί μετασχηματισμός στη χρονοκλίματα της δοκιμής, συνιστάται η κύρια μελέτη να πραγματοποιείται με ανάλυση τόσο της εδαφικής όσο και των υδατικών φάσεων.

Κατά τη διεξαγωγή αυτής της δοκιμής, είναι δυνατόν να προκύψουν δυσκολίες για ουσίες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), καθώς επίσης και για ουσίες με υψηλό φορτίο, λόγω του ότι η συγκέντρωση στην υδατική φάση δεν μπορεί να μετρηθεί αναλυτικά με επαρκή ορθότητα. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να λαμβάνονται πρόσθετα μέτρα. Οδηγίες για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών παρέχονται στα σχετικά κεφάλαια της παρούσας μεθόδου.

Κατά τη δοκιμή πτητικών ουσιών, θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια για την αποφυγή απωλειών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής.

1.7. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.7.1. **Όργανα και χημικά αντιδραστήρια**

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και ειδικότερα τα ακόλουθα:

α) Σωλήνες ή δοχεία για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Είναι σημαντικό οι σωλήνες αυτοί ή δοχεία:

— να ταιριάξουν απόλυτα στη φυγοκεντρική συσκευή για την ελαχιστοποίηση σφαλμάτων χειρισμού ή μεταφοράς,

— να είναι από αδρανές υλικό, ώστε να ελαχιστοποιείται η προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνειά τους.

▼B

β) Συσκευή αναδευσεως: overhead ανάμεικτης η ισοδύναμος εξοπλισμός. Η συσκευή αναδεύσεως θα πρέπει να διατηρεί το έδαφος εν αιωρήσει κατά τη διάρκεια της ανακίνησης.

γ) Φυγόκεντρος: κατά προτίμηση υψηλής ταχύτητας, π.χ. ταχύτητα φυγοκέντρησης > 3 000 g, ελεγχόμενης θερμοκρασίας και δυνάμενη να απομακρύνει σωματίδια με διάμετρο μεγαλύτερη από 0,2 μm από υδατικό διάλυμα. Τα δοχεία 9α πρέπει να είναι καλυμμένα κατά τη διάρκεια της ανάδευσης και φυγοκέντρησης για να αποφεύγονται απώλειες πτητικών συστατικών και νερού. Για την ελαχιστοποίηση της προσρόφησης σε αυτά, 9α πρέπει να χρησιμοποιούνται απενεργοποιημένα καλύμματα όπως βιδωτά πώματα επενδεδυμένα με τεφλόν.

δ) Προαιρετικό: διάταξη διηθήσεως: φίλτρα με πορώδες 0,2 μm, αποστειρωμένα, μιας χρήσεως. Ιδιαίτερη προσοχή 9α πρέπει να δίδεται στην επιλογή του υλικού του φίλτρου για να αποφεύγονται τυχόν απώλειες της υπό δοκιμή ουσίας σε αυτό. Στην περίπτωση ουσιών χαμηλής διαλυτότητας, συνιστάται η χρήση φίλτρων από οργανικό υλικό.

ε) Αναλυτικά όργανα, κατάλληλα για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας.

στ) Εργαστηριακός κλίβανος με δυνατότητα διατήρησης της Θερμοκρασίας στην περιοχή των 103 T έως 110 °C.

1.7.2. **Χαρακτηρισμός και επιλογή εδαφών**

Τα εδάφη 9α πρέπει να χαρακτηρίζονται με βάση τρεις παραμέτρους που θεωρούνται ως οι βασικοί παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η προσροφητική ικανότητα: την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, την περιεκτικότητα σε άργιλο και υφή του εδάφους και το pH. Όπως αναφέρθηκε ήδη (βλέπε πεδίο εφαρμογής), ρόλο στην προσρόφηση/εκρόφηση μιας συγκεκριμένης ουσίας μπορεί να παίζουν και άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους οι οποίες και 9α πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στις περιπτώσεις αυτές.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό των εδαφών παίζουν σπουδαίο ρόλο και μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στα αποτελέσματα. Συνιστάται λοιπόν το pH του εδάφους να μετριέται σε διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$ (δηλαδή το διάλυμα που χρησιμοποιείται στη δοκιμή προσρόφησης/εκρόφησης) σύμφωνα με την αντίστοιχη μέθοδο ISO (1SO-10390-1). Συνιστάται επίσης και οι υπόλοιπες σχετικές εδαφικές ιδιότητες να προσδιορίζονται σύμφωνα με τυποποιημένες μεθόδους (εγχειρίδιο ανάλυσης εδαφών ISO). Με τον τρόπο αυτό η ανάλυση των δεδομένων ρόφησης βασίζεται σε διεθνώς τυποποιημένες εδαφικές παραμέτρους. Ορισμένες οδηγίες για τις υφιστάμενες τυποποιημένες μεθόδους ανάλυσης και χαρακτηρισμού εδαφών περιλαμβάνονται στις παραπομπές (50-52). Για τη διακρίβωση των μεθόδων δοκιμής εδαφών, συνιστάται η χρήση εδαφών αναφοράς.

Οδηγίες για την επιλογή εδαφών για δοκιμές προσρόφησης/εκρόφησης δίνονται στον πίνακα 1. Τα επτά επιλεγόμενα εδάφη καλύπτουν τύπους εδαφών που απαντώνται σε εύκρατες γεωγραφικές ζώνες. Στην περίπτωση ιονισίμων προς δοκιμή ουσιών, τα επιλεγόμενα εδάφη θα πρέπει να καλύπτουν μία μεγάλη περιοχή pH, για να μπορεί να εκτιμηθεί η προσρόφηση της ουσίας στην ιονισμένη και μη ιονισμένη μορφή της. Οδηγίες σχετικά με το πόσα διαφορετικά εδάφη πρέπει να χρησιμοποιούνται στα διάφορα στάδια της δοκιμής δίνονται στο 1.9 «Εκτέλεση της δοκιμής».

Εφόσον προτιμηθούν άλλοι τύποι εδαφών, αυτά 9α πρέπει να χαρακτηρίζονται με τις ίδιες παραμέτρους και οι ιδιότητές τους να εμπίπτουν στις ίδιες περιοχές με εκείνες που περιγράφονται στον πίνακα 1, έστω κι αν δεν πληρούν απολύτως τα κριτήρια.

▼B

Πίνακας 1:

Οδηγίες επιλογής εδαφικών δειγμάτων για δοκιμές προσρόφησης-εκρόφησης

Τύπος εδάφους	Περιοχή pH (σε 0,01 M $CaCl_2$)	Περιεκτικότητα σε οργανικό άθρακα (%)	Περιεκτικότητα σε άργιλο (%)	Υφή εδάφους ([1])
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65-80	άργιλος
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20-40	αργιλώδης πηλός
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15-25	προσχωσιγενής άργιλος
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15-30	πηλός
5	< 4,0 - 6,0 ([2])	< 0,5 - 1,5 ([2]) ([3])	< 10-15 ([2])	αργιλώδης άμμος
6	> 7,0	< 0,5-1,0 ([2]) ([3])	40-65	αργιλοπηλός/άργυλος
7	< 4,5	> 10	< 10	άμμος/αργιλώδης άμμος

([1]) Σύμφωνά με το σύστημα FAO και το αμερικανικό σύστημα (85).
([2]) Οι αντιστοιχές μιεταβλητές θα πρεπει, κατά προτίμηση, να έχουν τιμές μέσα στην προβλεπόμενη περιοχή. Εάν, εντούτοις. συναντώντα. δυσκολίες στην ανεύρεση κατάλληλων εδαφών, είναι αποδεκτές και τιμές κάτω της υποδεικνυόμενης ελάχιστης τιμής.
([3]) Εδάφη με λιγότερο από 0,3 % οργανικό άνθρακα μπορεί να διαταρράξουν τη σχέση μεταξύ περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα και προσρόφησης. Συνιστάται λοιπόν η χρήση εδαφών με περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα τουλάχιστον 0,3 %.

1.7.3. **Συλλογή και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων**

1.7.3.1. *Συλλογή*

Δεν χρειάζονται εξειδικευμένες τεχνικές ή σύνεργα δειγματοληψίας. Η τεχνική δειγματοληψίας εξαρτάται από το σκοπό της μελέτης (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα:

α) απαιτούνται λεπτομερείς πληροφορίες για το ιστορικό του εδαφικού πεδίου συμπεριλαμβανομένης της τοποθεσίας, της βλάστησης, των χρήσεων γεωργικών φαρμάκων ή/και λιπασμάτων, βιολογικών προσθηκών ή τυχαίας μόλυνσης. Για την περιγραφή του τόπου δειγματοληψίας θα πρέπει να ακολουθούνται οι συστάσεις του προτύπου του ISO για τη δειγματοληψία εδαφών (ISO 10381-6)·

β) ο τόπος δειγματοληψίας πρέπει να ορίζεται με UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ή γεωγραφικές συντεταγμένες. Αυτό δίνει τη δυνατότητα επανασυλλογής ενός συγκεκριμένου εδάφους στο μέλλον ή μπορεί να βοηθήσει στο ορισμό του εδάφους με βάση διάφορα συστήματα ταξινόμησης που χρησιμοποιούνται σε διάφορες χώρες. Επίσης, θα πρέπει να συλλέγεται μόνον ορίζοντας A μέχρι μέγιστο βάθος 20 cm. Ειδικά στην περίπτωση του εδάφους αριθ. 7, εφόσον ως τμήμα του εδάφους υπάρχει ορίζοντας O_n, αυτός θα πρέπει να περιλαμβάνεται στη δειγματοληψία.

Τα δείγματα των εδαφών θα πρέπει να μεταφέρονται με περιέκτες και υπό συνθήκες θερμοκρασίας που να εγγυώνται ότι οι αρχικές ιδιότητες του εδάφους δεν πρόκειται να αλλοιωθούν σημαντικά.

▼B

1.7.3.2. *Αποθήκευση*

Προτιμάται η χρήση προσφάτως ληφθέντων εδαφών. Μόνον εφόσον αυτό δεν είναι δυνατό, τότε τα εδάφη θα πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και να διατηρούνται ξηραινόμενα στον αέρα. Δεν προβλέπεται κάποιο χρονικό όριο στην αποθήκευση, τα εδάφη όμως που αποθηκεύονται για διάστημα μεγαλύτερο των τριών χρόνων θα πρέπει να επανυποβάλλονται, πριν χρησιμοποιηθούν, σε ανάλυση ως προς την περιεκτικότητά τους σε οργανικό άνθρακα, και για το pH και τη CEC.

1.7.3.3. *Χειρισμός και προετοιμασία εδαφικών δειγμάτων για τη δοκιμή*

Τα εδάφη ξηραίνονται στον αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (κατά προτίμηση μεταξύ 20-25 °C). Τυχόν αποσυσ-σωμάτωση θα πρέπει να πραγματοποιείται με την ελάχιστη δυνατή δύναμη, έτσι ώστε η αρχική υφή του εδάφους να παραμένει κατά το δυνατόν αναλλοίωτη. Τα εδάφη κοσκινίζονται μέχρι μεγέθους σωματιδίων < 2 mm. Για το κοσκίνι-σμα, θα πρέπει να ακολουθούνται οι συστάσεις του προτύπου ISO για τη δειγματοληψία εδαφών (ISO 10381-6). Συνιστάται προσεκτική ομοιογενοποίηση, καθώς έτσι ενισχύεται η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων. Η υγρασία κάθε εδάφους προσδιορίζεται σε τρία δείγματα με θέρμανση στους 105 °C μέχρις ότου να μην υπάρχει καμία σημαντική μεταβολή στο βάρος (περίπου 12 ώρες). Για όλους τους υπολογισμούς η μάζα του εδάφους αναφέρεται σε ξηρά εκ κλιβάνου μάζα δηλαδή το βάρος του εδάφους διορθωμένο ως προς την υγρασία.

1.7.4. **Προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας για προσθήκη στο έδαφος**

Η υπό δοκιμή ουσία διαλύεται σε διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$ σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Το διάλυμα $CaCl_2$ χρησιμοποιείται ως η φάση υδατικού διαλύτη για τη βελτίωση της φυγοκέντρησης και την ελαχιστοποίηση της κατιο-νανταλλαγής. Η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι τρεις τάξεις μεγέθους υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου. Το ελάχιστο αυτό όριο διασφαλίζει την πραγματοποίηση επακριβών μετρήσεων σε σχέση με τη μεθοδολογία που ακολουθείται σε αυτή τη μέθοδο. Επιπλέον, η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος θα πρέπει να είναι μικρότερη από την υδατοδιαλυτότητα της υπό δοκιμή ουσίας.

Το αρχικό διάλυμα θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται λίγο πριν από την προσθήκη του σε εδαφικά δείγματα και να διατηρείται κλειστό στο σκότος στους 4 °C. Ο χρόνος αποθήκευσης εξαρτάται από τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας και τη συγκέντρωση της στο διάλυμα.

Αποκλειστικά στην περίπτωση ασθενώς διαλυτών ουσιών ($S_w < 10^{-4}$ γ $λ^{-1}$), μπορεί να χρειάζεται ένας κατάλληλος διαλυτοποιητικός παράγοντας όταν η υπό δοκιμή ουσία είναι δύσκολο να διαλυθεί. Ο διαλυτοποιητικός αυτός παράγοντας: α) θα πρέπει να αναμειγνύεται με νερό όπως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο- β) η συγκέντρωση του δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 1 % του συνολικού όγκου του αρχικού διαλύματος, ενώ θα πρέπει να είναι μικρότερη από αυτή στο διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας που θα έλθει σε επαφή με το έδαφος (κατά προτίμηση, μικρότερη του 0,1 %) και γ) δεν θα πρέπει να είναι τασιενεργός ή να υφίσταται διαλυτολυτικές αντίδρασεις με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εφόσον χρησιμοποιείται διαλυτοποιητικός παράγοντας, αυτό θα πρέπει να προσδιορίζεται και να αιτιολογείται στην αναφορά των στοιχείων.

Μια άλλη εναλλακτική λύση για τις ασθενώς διαλυτές ουσίες είναι η προσθήκη της υπό δοκιμή ουσίας στο υπό δοκιμή σύστημα μέσω οργανικού διαλύτη: η υπό δοκιμή ουσία διαλύεται σε οργανικό διαλύτη και ποσότητα αυτού προστίθεται στο σύστημα εδάφους και διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Η περιεκτικότητα του οργανικού διαλύτη στην υδατική φάση θα πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατό χαμηλότερη, χωρίς να υπερβαίνει κανονικά το 0,1 %. Η προσθήκη μέσω οργανικού διαλύματος μπορεί να παρουσιάζει αδυναμία στο θέμα της ογκομετρικής επαναληψιμότητας. Έτσι, μπορεί να εισαχθεί ένα πρόσθετο σφάλμα καθώς η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας και του συνδιαλύτη μπορεί να μην είναι η ίδια σε όλες τις δοκιμές.

▼B

1.8. ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΕΙΣ ΠΑ ΤΗ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ/ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ

1.8.1. **Αναλυτική μέθοδος**

Στις βασικές παραμέτρους που μπορεί να επηρρεάσουν την ορθότητα των μετρήσεων ρόφησης περιλαμβάνονται η ορθότητα της αναλυτικής μεθόδου στην ανάλυση τόσο του διαλύματος όσο και των προσροφημένων φάσεων, η σταθερότητα και καθαρότητα της υπό δοκιμή ουσίας, η επίτευξη ισορροπίας ρόφησης, το μέγεθος της μεταβολής της συγκέντρωσης του διαλύματος, ο λόγος εδάφους/διάλυμα και οι μεταβολές στη δομή του εδάφους κατά τη διάρκεια της διεργασίας αποκατάστασης ισορροπίας (3 5) (59-62). Μερικά παραδείγματα σχετικά με θέματα ορθότητας δίδονται στο προσάρτημα 2.

Η αξιοπιστία της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου πρέπει να ελέγχεται στην περιοχή συγκεντρώσεων που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Ο πειραματιζόμενος θα πρέπει να έχει την ελευθερία ανάπτυξης κατάλληλης μεθόδου με την κατάλληλη ορθότητα, ακρίβεια, αναπαραγωγιμότητα, όρια ανίχνευσης και ανάκτηση. Οδηγίες για την εκτέλεση της δοκιμής δίδονται στο πείραμα που περιγράφεται παρακάτω.

Κατάλληλος όγκος διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$, π.χ. 100 cm^3, αναδεύεται για 4 ώρες με ποσότητα εδάφους, π.χ. 20 g, υψηλής προσροφησιμότητας, δηλαδή με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικά άνθρακα και άργιλο. Οι τιμές αυτές βαρών και όγκων μπορούν να διαφοροποιούνται ανάλογα με τις αναλυτικές ανάγκες, ένα όμως πρόσφορο σημείο εκκίνησης είναι ένας λόγος εδάφους/διάλυμα 1:5. Το μείγμα φυγοκεντρείται και η υδατική φάση μπορεί να διηθηθεί. Στην τελευταία προστίθεται ορισμένος όγκος του αρχικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας ώστε να επιτευχθεί ονομαστική συγκέντρωση στα πλαίσια της περιοχής συγκεντρώσεων που έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Ο όγκος αυτός δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10 % του τελικού όγκου της υδατικής φάσης έτσι ώστε η μεταβολή στη φύση του προ της αποκατάστασης ισορροπίας διαλύματος να είναι όσο το δυνατό μικρότερη. Το διάλυμα υποβάλλεται σε ανάλυση.

Στην όλη διαδικασία πρέπει να περιλαμβάνεται και η ανάλυση τυφλού δείγματος αποτελούμενου από σύστημα εδάφους + διαλύματος $CaCl_2$ (χωρίς υπό δοκιμή ουσία) για να ελέγχεται η τυχόν ύπαρξη τεχνικών σφαλμάτων στην αναλυτική μέθοδο ή παρενεργειών από το έδαφος.

Στις αναλυτικές μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις ροφήσεως περιλαμβάνονται η χρωματογραφία αερίου-υγρού (GLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η φασματομετρία (π.χ. φασματομε-τρία GC/μάζας, φασματομετρία HPLC/μάζας) και η καταμέτρηση σπινθηρισμού σε υγρό (για ραδιοεπισημασμένες ουσίες μόνο). Ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο, ως κατάλληλα ποσοστά ανακτήσεως θεωρούνται ποσοστά μεταξύ 90 % και 110 % της ονομαστικής τιμής. Για να μπορεί να γίνει ανίχνευση και αξιολόγηση μετά την κατανομή, τα όρια ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους κάτω της ονομαστικής συγκεντρώσεως.

Τα χαρακτηριστικά και τα όρια ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου που διατίθεται για την εκτέλεση των μελετών προσρόφησης παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής και την όλη πειραματική εκτέλεση της δοκιμής. Η μέθοδος αυτή ακολουθεί μια γενική πειραματική οδό και αποτελεί πηγή καθοδήγησης και κατευθύνσεων για εφαρμογή εναλλακτικών λύσεων αν τυχόν η αναλυτική μέθοδος και οι εργαστηριακές εγκαταστάσεις επιβάλλουν κάποιους περιορισμούς.

▼B

1.8.2. **Επιλογή των άριστων λόγων εδάφοιις/διάλυμα**

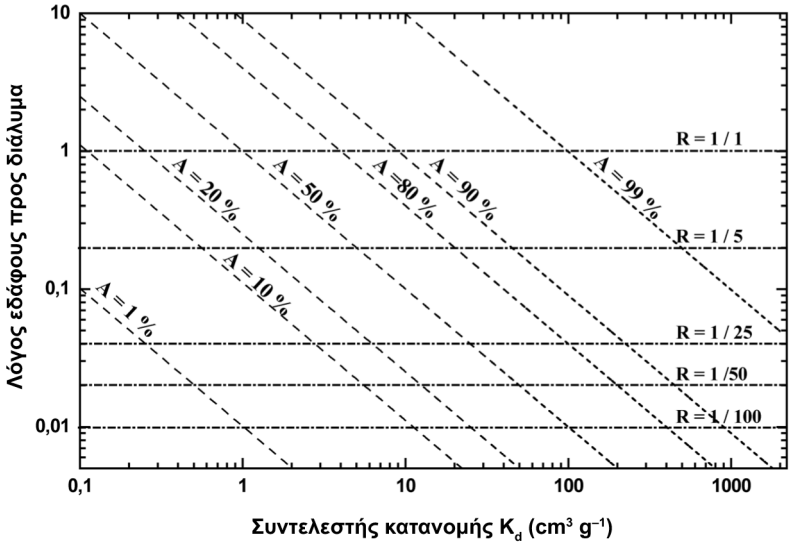
Η επιλογή των κατάλληλων λόγων εδάφους προς διάλυμα στις μελέτες προσρόφησης εξαρτάται από το συντελεστή κατανομής K_d και το σχετικό επιθυμητό βαθμό προσρόφησης. Η μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα καθορίζει τη στατιστική ορθότητα της μέτρησης με βάση τη μορφή της εξίσωσης προσρόφησης και το όριο της αναλυτικής μεθοδολογίας, στην ανίχνευση της συγκέντρωσης της διαλελυμένης χημικής ουσίας. Συνεπώς, στην πράξη, είναι χρήσιμο να καθορίζονται μερικοί πάγιοι λόγοι στους οποίους το προσροφούμενο ποσοστό να είναι πάνω από 20 % και, κατά προτίμηση, > 50 % (62), ενώ ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται ώστε η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση να διατηρείται αρκετά υψηλή για να λαμβάνονται ορθές μετρήσεις. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση υψηλών ποσοστών προσρόφησης.

Μια πρόσφορη προσέγγιση στην επιλογή των κατάλληλων λόγων εδάφους/νερό βασίζεται στον υπολογισμό της τιμής K_d είτε με προκαταρκτικές μελέτες είτε με καθιερωμένες τεχνικές εκτίμησης (προσάρτημα 3). Κατόπιν, μπορεί να γίνει επιλογή του κατάλληλου λόγου με βάση την καμπύλη των λόγων εδάφους/διάλυμα συναρτήσει των K_d νια συγκεκριμένα ποσοστά προσρόφησης (εικόνα 1). Στην γραφική αυτή παράσταση υποτίθεται ότι η εξίσωση προσρόφησης είναι γραμμική [1]. Η προς εφαρμογή σχέση λαμβάνεται με αναδιασκευή της εξίσωσης (4) του K_d στη μορφή της εξίσωσης (T):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

ή στη λογαριθμική της μορφή όπου $R = m_{soie}/Vo$ και A_{eq} %/100 $= \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad (2)$$



Εικόνα 1. Σχέση μεταξύ λόγων εδάφους προς διάλυμα και τιμών K_d για διάφορα ποσοστά προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας

[1] $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

Στην εικόνα 1 εμφαίνονται οι λόγοι εδάφους/διάλυμα σε συνάρτηση με τις τιμές K_d για διάφορα επίπεδα προσρόφησης. Για παράδειγμα, με λόγο εδάφους/διάλυμα 1:5 και τιμή K_d=20, η προσρόφηση ανέρχεται περίπου στο 80 %. Για την επίτευξη προσρόφησης 50 % με τον ίδιο K_d, πρέπει να χρησιμοποιη9εί λόγος 1:25. Η προσέγγιση αυτή για την επιλογή των κατάλληλων λόγων εδάφους/διάλυμα παρέχει στον ερευνητή άνεση στην αντιμετώπιση των διαφόρων πειραματικών αναγκών.

Οι περιπτώσεις που είναι δυσκολότερο να αντιμετωπιστούν είναι εκείνες όπου η ουσία προσροφάται σε υψηλό ή πολύ χαμηλό βαθμό. Όταν η προσρόφηση είναι χαμηλή, συνιστάται λόγος εδάφους/-διάλυμα 1:1, αν και στην περίπτωση ορισμένων πολύ οργανικών εδαφικών τύπων μπορεί να χρειάζονται μικρότεροι λόγοι για τη λήψη υδαρούς αιωρήματος. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε με την αναλυτική μεθοδολογία να μετρώνται μικρές μεταβολές στη συγκέντρωση του διαλύματος, Διαφορετικά, η μέτρηση προσροφήσεως δεν 9α είναι ακριβής. Από την άλλη μεριά, στην περίπτωση πολύ υψηλών συντελεστών κατανομής K_d, μπορεί να φθάσουμε σε τιμές λόγου 1:100 εδάφους/διάλυμα για να παραμείνει σημαντική ποσότητα ουσίας στο διάλυμα. Εντούτοις, πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να διασφαλίζεται καλή ανάμειξη, να αφήνεται δε ικανός χρόνος για την αποκατάσταση ισορροπίας στο σύστημα. Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι να προβλεφθεί η τιμή K_d εφαρμόζοντας τεχνικές εκτίμησης που βασίζονται, π.χ., στις τιμές P_{OW} (προσάρτημα 3). Η προσέγγιση αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη νια πολικές ουσίες χαμηλής προσρόφησης με $P_{ow} < 20$ και υψηλής ροφησιμότητας λιπόφιλες ουσίες με $P_{ow} > 10^4$.

1.9. ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.9.1. **Συνθήκες δοκιμής**

Όλα τα πειράματα γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και, εφόσον είναι δυνατό, σε σταθερή θερμοκρασία μεταξύ 20 °C και 25 °C.

Με τις εφαρμοζόμενες συνθήκες φυγοκέντρησης θα πρέπει να μπορούν να απομακρύνονται από το διάλυμα σωματίδια με μέγεθος μεγαλύτερο από 0,2 μm. Η τιμή αυτή εκφράζει το μικρότερο σωματίδιο που θεωρείται ως στερεό σωματίδιο και αποτελεί το όριο μεταξύ στερεάς και κολλοειδούς καταστάσεως. Οδηγίες για τον καθορισμό των συνθηκών φυγοκέντρησης δίδονται στο προσάρτημα 4.

Εαν με τον υφιστάμενο φυγοκεντρικό εξοπλισμό δεν μπορεί να διασφαλιστεί η απομάκρυνση σωματιδίων μεγαλύτερων από 0,2 μm, μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνδυασμός φυνοκέντρησης και διήθησης με φίλτρα 0,2 μm. Τα φίλτρα αυτά θα πρέπει να είναι από κατάλληλο αδρανές υλικό νια την αποφυγή τυχόν απωλειών της υπό δοκιμή ουσίας σε αυτά. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι δεν υπάρχει περίπτωση απωλειών της υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια της διήθησης.

1.9.2. **Μέρος 1 — Προκαταρκτική μελέτη**

Ο σκοπός της διεξαγωγής προκαταρκτικής μελέτης έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο του πεδίου εφαρμογής. Κατευθύνσεις για τη διεξαγωγή της δοκιμής αυτής δίδονται με το περιγραφόμενο κατωτέρω πείραμα.

1.9.2.1. *Επιλογή των άριστων λόγων εδάφους/διάλυμα*

Χρησιμοποιούνται δύο τύποι εδαφών και τρεις λόγοι εδάφους/διάλυμα (έξι πειράματα). Ο ένας τύπος εδάφους έχει υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και χαμηλή σε άργιλο ενώ ο άλλος έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και υψηλή σε άργιλο. Προτείνονται οι ακόλουθοι λόγοι:

— 50 g εδάφους και 50 cm^3 υδατικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (λόγος 1/1),

▼B

— 10 g εδάφους και 50 cm^3 υδατικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (λόγος 1/5),

— 2 g εδάφους και 50 cm^3 υδατικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (λόγος 1/25).

Η ελάχιστη ποσότητα εδάφους στην οποία μπορεί να εκτελεστεί το πείραμα εξαρτάται από τον εργαστηριακό εξοπλισμό και την απόδοση των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών μεθόδων. Πάντως, συνιστάται να χρησιμοποιείται ποσότητα τουλάχιστον 1 g, και κατά προτίμηση 2 g, για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων από τη δοκιμή.

Σε δείγμα-μάρτυρα που αποτελείται μόνον από την υπό δοκιμή ουσία σε διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$ (χωρίς έδαφος) εφαρμόζονται τα ίδια ακριβώς βήματα όπως και στα υπό δοκιμή συστήματα, για να ελεγχθεί η σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα του $CaCl_2$ και η πιθανή της προσρόφηση στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων.

Για κάθε τύπο εδάφους διενεργείται τυφλό πείραμα με την ίδια ποσότητα εδάφους και συνολικό όγκο 50 cm^3 διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ (χωρίς υπό δοκιμή ουσία) ακολουθώντας την ίδια διαδικασία δοκιμής. Το πείραμα αυτό χρησιμεύει ως βασικός μάρτυρας κατά τη διάρκεια της ανάλυσης για την ανίχνευση τυχόν παρεμβαινουσών ουσιών ή μολυσμένων εδαφών.

Όλα τα πειράματα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων και των τυφλών, θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον εις διπλούν. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη μπορεί να υπολογιστεί με βάση τη μεθοδολογία που θα ακολουθηθεί.

Οι μέθοδοι για την προκαταρκτική μελέτη και την κύρια μελέτη είναι γενικά οι ίδιες, τυχόν δε εξαιρέσεις πρέπει να αναφέρονται.

Τα ξηραμένα στον αέρα δείγματα φέρονται σε κατάσταση ισορροπίας αναδεύοντας τα με 45 $cm^3$0,01 M $CaCl_2$ όλη διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας μέχρι τελικού όγκου 50 cm^3. Ο προστιθέμενος αυτός όγκος αρχικού διαλύματος: (α) δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10 % του τελικού όγκου των 50 cm^3 της υδατικής φάσης ώστε η μεταβολή στη φύση του προ της ισορροπίας διαλύματος να είναι όσο το δυνατό μικρότερη και (β) θα πρέπει κατά προτίμηση να οδηγεί σε μία αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας που έρχεται σε επαφή με το έδαφος (C_0) δύο τάξεις μεγέθους τουλάχιστον υψηλότερη από το όριο ανιχνεύσεως της αναλυτικής μεθόδου. Το ελάχιστο αυτό όριο εξασφαλίζει την πραγματοποίηση ορθών μετρήσεων ακόμη κι όταν υπάρχει υψηλή προσρόφηση (> 90 %) και τον προσδιορισμό αργότερα των ισόθερμων προσρόφησης. Συνιστάται επίσης, εφόσον είναι δυνατό, η αρχική συγκέντρωση της ουσίας (C_0) να μην υπερβαίνει το ήμισυ του ορίου διαλυτότητας της.

Ένα παράδειγμα του τρόπου υπολογισμού της συγκέντρωσης του αρχικού διαλύματος (C_{5t}) δίδεται παρακάτω. Υποτίθεται ότι το όριο ανίχνευσης είναι 0,01 μg cm^{-3} και η προσρόφηση 90 %. Έτσι, η αρχική συγκέντρωση της σε επαφή με το έδαφος υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει κατά προτίμηση να είναι 1 μg cm^3 (δύο τάξεις μεγέθους υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης). Υποθέτοντας ότι προστίθεται ο μέγιστος συνιστώμενος όγκος του αρχικού διαλύματος δηλαδή 5 έως 45 cm^3 διαλύματος εξισορρόπησης 0,01 M $CaCl_2$ (= 10 % του αρχικού διαλύματος έως τα 50 cm^3 συνολικού όγκου της υδατικής φάσης), η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος θα πρέπει να είναι 10 μg cm^{-3}. Η τιμή αυτή είναι τρεις τάξεις μεγέθους υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου.

Πριν και μετά την επαφή με το έδαφος θα πρέπει να μετριέται το pH της υδατικής φάσης επειδή παίζει σπουδαίο ρόλο στην όλη διεργασία προσρόφησης, ειδικά στην περίπτωση ιονισιμων ουσιών.

▼B

Το μείγμα ανακινείται μέχρις ότου επιτευχθεί ισορροπία προσρόφησης. Ο χρόνος ισορροπίας στα διάφορα εδάφη παρουσιάζει υψηλή διαφοροποίηση, ανάλογα με την ουσία και το έδαφος. Γενικά, 24 ώρες είναι αρκετές (77). Στην προκαταρκτική μελέτη, τα δείγματα μπορούν να συλλέγονται αλληλοδιαδοχως μέσα σε 48ωρο διάστημα ανάμειξης (π.χ. 4, 8, 24, 48 ώρες). Εντουτοις, οι χρόνοι αναλύσεως θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με ελαστικότητα σε σχέση με το χρονοδιάγραμμα στο εργαστήριο.

Υπάρχουν δυο επιλογές για την ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας στο υδατικό διάλυμα: (α) η παράλληλη μέθοδος και (β) η εν σειρά μέθοδος. Θα πρέπει να τονιστεί ότι, αν και η παράλληλη μέθοδος είναι πειραματικά πιο κουραστική, η μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι απλούστερη (προσάρτημα 5). Πάντως, η επιλογή της μεθοδολογίας που πρέπει να ακολουθηθεί, επαφίεται στον πειραματιζόμενο ο οποίος θα πρέπει να εξετάζει τις διαθέσιμες εργαστηριακές διευκολύνσεις και πόρους.

α) παράλληλη μέθοδος: παρασκευάζονται δείγματα με τον ίδιο λόγο εδάφους/διάλυμα, τόσα όσα και τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα στα οποία επιθυμείται να μελετηθεί η κινητική προσρόφησης. Μετά τη φυγοκέντρηση και, εφόσον επιθυμείται, τη διήθηση, η υδατική φάση του πρώτου σωλήνα ανακτάται όσο το δυνατό πληρέστερα και μετριέται μετά από π.χ. 4 ώρες, εκείνη του δεύτερου σωλήνα μετά από 8 ώρες, εκείνη του τρίτου σωλήνα μετά από 24 ώρες κ.λπ.

β) εν σειρά μέθοδος: για κάθε λόγο εδάφους/διάλυμα παρασκευάζεται μόνον ένα διπλό δείγμα. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα το μείγμα φυγοκεντρείται για να διαχωριστούν οι φάσεις. Μικρή ποσότητα της υδατικής φάσης υποβάλλεται αμέσως σε ανάλυση για την υπό δοκιμή ουσία, κατόπιν δε το πείραμα συνεχίζεται με το αρχικό μείγμα. Εφόσον μετά τη φυγοκέντρηση ακολουθεί διήθηση, το εργαστήριο θα πρέπει να διαθέτει το σχετικό εξοπλισμό για το χειρισμό της διήθησης μικρών υδατικών ποσοτήτων. Συνιστάται ο συνολικός όγκος των λαμβανομένων ποσοτήτων να μην υπέρβαινει το 1 % του συνολικού όγκου του διαλύματος, για να μην αλλάζει σημαντικά ο λόγος εδάφους/διάλυμα και μειώνεται η μάζα της διαθέσιμης για προσρόφηση κατά τη διάρκεια της δοκιμής διαλελυμένης ουσίας.

Η ποσοστιαία προσρόφηση A_{t_i} υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή (η) με βάση την ονομαστική αρχική συγκέντρωση και τη μετρούμενη συγκέντρωση κατά το χρόνο δειγματοληψίας (t_i), διορθωμένη ως προς I $@A_{t_i}$ την τιμή του τυφλού. Για την εκτίμηση της επίτευξης κατάστασης ([1]) ισορροπίας χαράσσονται καμπύλες της At_i συναρτήσει του χρόνου (εικόνα 1 προσάρτημα 5) ενώ υπολογίζεται επίσης και η τιμή K_d στην ισορροπία. Με βάση την τιμή αυτή K_d, επιλέγονται από την εικόνα 1 κατάλληλοι λόγοι εδάφους/διάλυμα, έτσι ώστε η εκατοστιαία προσρόφηση να φθάνει πάνω από το 20 % και κατά προτίμηση >50 % (61). Όλες οι εφαρμοζόμενες εξισώσεις και αρχές σχεδιασμού της γραφικής παράστασης δίδονται στο τμήμα «Δεδομένα και έκθεση αναφοράς» και στο προσάρτημα 5.

1.9.2.2. *Προσδιορισμός του χρόνου αποκατάστασης ισορροπίας προσρόφησης και της ποσότητας της προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας κατά την ισορροπία.*

Όπως αναφέρθηκε ήδη με τις γραφικές παραστάσεις των A_{t_i} η C_{aq}^{ads} συναρτήσει του χρόνου επιτυγχάνεται η εκτόπιση της επίτευξης ισορροπίας προσρόφησης και της ποσότητας της προσροφημένης στ ην ισορροπία υπό δοκιμή ουσίας. Στις εικόνες 1 και 2 του προσαρτήματος 5 εμφαίνονται παραδείγματα τέτοιων γραφικών παραστάσεων. Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας είναι ο χρόνος που χρειάζεται το σύστημα για να φθάσει σε οριζοντίωση της καμπύλης.

([1]) Οι γραφικές παραστάσεις συνκεντρωσης της υπό δοκιμη ουσίας στην υδατική φάση (C_{aq}^{ads}) συναρτήσει τον χρόνου θα απορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την εκτιμηση της επίτευξης κατάστασης ισορροπίας (βλέπε εικόνα 2 παραρτηια 5).

▼B

Εάν, σε ένα συγκεκριμένο έδαφος, δεν εμφανίζεται οριζοντίωση αλλά μόνο σταθερή αύξηση, αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους πολύπλοκους παράγοντες όπως βιοαποικοδόμηση ή βραδεία διάχυση. Το φαινόμενο της βιοαποικοδό-μησης μπορεί να καταδειχθεί επαναλαμβάνοντας το πείραμα με ένα στείρο δήγμα εδάφους. Εάν, ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, δεν εμφανιστεί οριζοντίωση, ο πειραματιζόμενος θα πρέπει να ερευνήσει και για άλλα φαινόμενα που μπορεί να εμπλέκονται στις συγκεκριμένες μελέτες του. Αυτό μπορεί να γίνει με κατάλληλες τροποποιήσεις των συνθηκών πειραματισμού (θερμοκρασία, χρόνοι ανάδευσης, λόγοι εδάφους/διάλυμα). Εναπόκειται στον πειραματιζόμενο να αποφασίσει αν θα συνεχίσει τη διαδικασία δοκιμής παρά το ενδεχόμενο αποτυχίας στην αποκατάσταση ισορροπίας.

1.9.2.3. *Προσρόφηση στην επιφάνεια του δοκιμαστικού δοχείου και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας*

Από την ανάλυση των δειγμάτων-μαρτύρων μπορεί να ληφθούν ορισμένες πληροφορίες για την προσρόφηση της υπό δοκιμή ουσίας στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων. Εάν παρατηρηθεί έλλειμμα μεγαλύτερο από το τυποποιημένο σχιάλμα της αναλυτικής μεθόδου, αυτό μπορεί να σημαίνει την ύπαρξη αβιοτικής αποικοδόμησης ή/και προσρόφησης στην επιφάνεια του δοκιμαστικού δοχείου. Διάκριση μεταξύ των δύο αυτών φαινομένων μπορεί να γίνει πλένο\τας προσεκτικά τα τοιχώματα του δοχείου με γνωστό όγκο κατάλληλου διαλύτη και υποβάλλοντας το διάλυμα πλύσεως σε ανάλυση για την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων δεν παρατηρηθεί προσρόφηση, το έλλειμμα αποδεικνύει αβιοτική αστάθεια της υπό δοκιμή ουσίας. Εφόσον διαπιστωθεί προσρόφηση, είναι αναγκαία η αλλαγή του υλικού των δοκιμαστικών δοχείων. Πάντως, τα δεδομένα για την προσρόφηση στην επιφάνεια των δοκιμαστικών δοχείων που λαμβάνονται από αυτό το πείραμα δεν μπορούν να παρεκταθούν άμεσα στο πείραμα εδάφους/-διάλυμα. Η παρουσία του εδάφους επηρεάζει την προσρόφηση αυτή.

Πρόσθετες πληροφορίες για τη σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας μπορούν να αντληθούν προσδιορίζοντας το υπόλοιπο της αρχικής μάζας κατά τη διάρκεια του χρόνου. Αυτό σημαίνει ότι πραγματοποιείται ανάλυση για την υπό δοκιμή ουσία στην υδατική φάση, στα εδαφικά εκχυλίσματα και τα τοιχώματα του δοκιμαστικού δοχείου. Η διαφορά μεταξύ της μάζας της προστιθέμενης υπό δοκιμή ουσίας και του αθροίσματος των μαζών της χημικής ουσίας στην υδατική φάση, τα εδαφικά εκχυλίσματα και τα τοιχώματα του δοκιμαστικού δοχείου, είναι ίση με την αποικοδο-μημένη μάζα ή/και απωλεσθείσα λόγω πτητικότητας η/και μη εκχυλισθείσα. Για τον προσδιορισμό του υπολοίπου, θα πρέπει να έχει αποκατασταθεί ισορροπία προσρόφησης μέσα στο χρονικό διάστημα του πειράματος.

Η ανάλυση για το υπόλοιπο μάζας εκτελείται σε εδάφη και για ένα λόγο εδάφους/διάλυμα ανά έδαφος που εμφανίζει έλλειμμα πάνω από 20 % και κατά προτίιιηση> 50 % στην κατάσταση ισορροπίας. Όταν το πείραμα ανεύρεσης του λόγου ολοκληρωθεί με την ανάλυση του τελευταίου δείγματος της υδατικής φάσης μετά από 48 ώρες. οι φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση και, εφόσον επιθυμείται, διήθηση. Η υδατική φάση ανακτάται όσο το δυνατό πληρέστερα και στο έδαφος προστίθεται κατάλληλος διαλύτης εκχυλίσεως (συντελεστής εκχυλίσεως τουλάχιστον 95 %) για την εκχύλιση της υπό δοκιμή ουσίας. Συνιστάται η πραγματοποίηση δύο τουλάχιστον διαδοχικών εκχυλίσεων. Προσδιορίζεται η ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος και τα εκχυλίσματα του δοκιμαστικού δοχείου και υπολογίζεται το υπόλοιπο μάζας (εξίσωση 10, «Δεδομένα και έκθεση αναφοράς»). Εάν είναι λιγότερο από 90 %, η υπό δοκιμή ουσία θεωρείται ως ασταθής στη χρονοκλίμακα της δοκιμής. Πάντως, οι μελέτες μπορούν ακόμη να συνεχιστούν, λαμβάνοντας υπόψη την αστάθεια της υπό δοκιμή ουσίας. Στην περίπτωση αυτή, συνιστάται να υποβάλλονται σε ανάλυση και οι δύο φάσεις στην κύρια μελέτη.

▼B

1.9.3. *Μέρος 2 — Κινητική προσρόφησης σε μία συγκέντωση της υπό δοκιμή ουσίας*

Χρησιμοποιούνται πέντε εδάφη που επιλέγονται από τον πίνακα 1. Το να συμπεριληφθούν μεταξύ των πέντε αυτών εδαφών ορισμένα ή και όλα τα εδάφη που χρησιμοποιούνται στην προκαταρκτική μελέτη, αποτελεί πλεονέκτημα. Στην περίπτωση αυτή, το μέρος 2 δεν χρειάζεται να επαναληφθεί για τα εδάφη που χρησιμοποιούνται στην προκαταρκτική μελέτη.

Ο χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας, ο λόγος εδάφους/διάλυμα, το βάρος του εδαφικού δείγματος, ο όγκος της υδατικής φάσης που είναι σε επαφή με το έδαφος και η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα επιλέγονται με βάση τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής μελέτης. Η ανάλυση θα πρέπει να γίνεται κατά προτίμηση περίπου μετά από 2, 4, 6, 8 (ενδεχομένως και 10) και 24 ώρες επαφής. Ο χρόνος ανάδευσης μπορεί να φθάσει το πολύ τις 48 ώρες στην περίπτωση που μια χημική ουσία απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο αποκατάστασης ισορροπίας σε σχέση με τα αποτελέσματα εύρεσης του λόγου. Πάντως, οι χρόνοι ανάλυσης μπορούν να αντιμετωπίζονται με ελαστικότητα.

Κάθε πείραμα (ένα έδαφος και ένα διάλυμα) γίνεται τουλάχιστον εις διπλούν για να μπορέσει να γίνει εκτίμηση της διακύμανσης των αποτελεσματων. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνεται και ένα τυφλό. Αποτελείται από το έδαφος και διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$, χωρίς υπό δοκιμή ουσία, ενώ το βάρος και ο όγκος, αντίστοιχα, είναι ίδιος με εκείνους του πειράματος. Δείγμα-μάρτυρας που περιέχει μόνο την υπό δοκιμή ουσία σε διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$ (χωρίς έδαφος) υποβάλλεται την ίδια διαδικασία δοκιμής, ενέργεια που αποβλέπει στη διασφάλιση του πειράματος από τυχόν απρόσμενα.

Η ποσοστιαία προσρόφηση υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή A_{t_i} ή/και χρονικό διάστημα $A_{\Delta t_i}$ (ανάλογα με τις ανάγκες) και παρίσταται ως γραφική συνάρτηση του χρόνου. Υπολογίζονται επίσης ο συντελεστής κατανομής K_d στην ισορροπία καθώς επίσης και ο τυποποιημένος συιτελεστής κατανομής οργανικού άνθρακα K_{oc} (για μη πολικές οργανικές χημικές ουσίες).

Αποτελέσματα της δοκιμής κινητικής προσροφήσεως

Η γραμμική K_d τιμή περιγράφει γενικά με ορθότητα τη ροφητική συμπεριφορά στο έδαφος (35) (78) και αποτελεί έκφραση της εγγενούς κινητικότητας των χημικών στο έδαφος. Σε γενικές γραμμές, π.χ., ουσίες με $K_d < 1$ ψμ^3 γ^{-1} θεωρούνται ως ποιοτικώς κινητικές. Ομοίως, από τους MacCall *et al.* (16), έχει αναπτυχθεί ένα σχήμα ταξινόμησης κινητικοτήτων με βάση τις τιμές K_{oc}. Επιπλέον, υπάρχουν σχήματα ταξινόμησης αποπλύσεων που βασίζονται σε μία σχέση μεταξύ K_{oc} και DT-50 ([1]) (32) (79).

Επίσης, σύμφωνα με μελέτες ανάλυσης σφαλμάτων (61), τιμές K_d κάτω των 0,3 cm^3 γ^{-1} δεν μπορούν να εκτιμηθούν ορθά από τη μείωση της συγκεντρώσεως στην υδατική φάση, ακόμη κι όταν εφαρμόζεται η ευνοϊκότερη (από πλευράς ορθότητας) σχέση εδάφους/διάλυμα, δηλαδή 1:1. Στην περίπτωση αυτή, συνιστάται να γίνεται ανάλυση και των δύο φάσεων, εδάφους και διαλύματος.

([1]) DT-50: χρόνος αποικοδόμησης για το 50 % της υπό δοκιμη ουσίας.

▼B

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, συνιστάται η μελέτη της προσροφητικής συμπεριφοράς μιας ουσίας στο έδαφος και της εν δυνάμει κινητικότητάς της να συνεχίζεται προσδιορίζοντας τις ισόθερμους προσροφήσεως Freund-lich για τα συστήματα αυτά, για τα οποία είναι δυνατός ο ορθός προσδιορισμός της K_d με το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθείται στη μέθοδο αυτή δοκιμής. Ο ορθός προσδιορισμός είναι δυνατός εάν η τιμή η οποία προκύπτει πολλαπλασιάζοντας την K_d με το λόγο εδάφους/διάλυμα είναι > 0,3, όταν οι μετρήσεις βασίζονται στη μείωση της συγκέντρωσης στην υδατική φάση (έμμεση μέθοδος), ή > 0,1, όταν αναλύονται και οι δύο φάσεις (άμεση μέθοδος) (61).

1.9.4. *Μέρος 3 — Ισόθερμοι προσρόφησης και κινητική εκρόφησης/ισόθερμοι εκρόφησης*

1.9.4.1. Ισόθερμοι προσρόφησης

Χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις υπό δοκιμή ουσίας, που καλύπτουν κατά προτίμηση δύο τάξης μεγέθους. Για την επιλογή αυτών των συγκεντρώσεων, θα πρέπει να λαμβάνο\ται υπόψη η υδατοδιαλυτότητα και οι προκύπτουσες συγκεντρώσεις υδατικής ισορροπίας. Καθ' όλη τη μελέτη, θα πρέπει να τηρείται ο ίδιος λόγος εδάφους/διάλυμα κατά έδαφος. Η δοκιμή προσρόφησης εκτελείται όπως περιγράφεται ανωτέρω, με μόνη τη διαφορά ότι η υδατική φάση αναλύεται μόνο μία φορά κατά το χρόνο που απαιτείται για την επίτευξη ισορροπίας όπως προσδιορίστηκε προ-ηγουμένως στο μέρος 2. Οι συγκεντρώσεις ισορροπίας στο διάλυμα προσδιορίζονται και η προσροφημένη ποσότητα υπολογίζεται από τη μείωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα ή με την άμεση μέθοδο. Η προσροφημένη μάζα ανά μονάδα μάζας εδάφους παρίσταται ως συνάρτηση της συγκέντρωσης ισορροπίας της υπό δοκιμή ουσίας (βλέπε «Δεδομένα και έκθεση αναφοράς»).

Αποτελέσματα από το πείραμα ισοθέρμων προσρόφησης

Μεταξύ των μέχρι τούδε προταθέντων μαθηματικών μοντέλων προσρόφησης, η ισόθερμος Freundlich είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη για την περιγραφή διεργασιών προσρόφησης. Λεπτομερέστερες πληροφορίες για την ερμηνεία και σπουδαιότητα των μοντέλων προσρόφησης παρέχονται στις παραπομπές (41) (45) (80) (81) (82).

Σημείωση: Θα πρέπει να αναφερθεί ότι σύγκριση τιμών K_F (συντελεστής προσρόφησης Freundlich) για διάφορες ουσίες είναι δυνατή μόνον εφόσον αυτές οι τιμές $K_Φ$ εκφράζονται στις ίδιες μονάδες (83).

1.9.4.2. Κινητική εκρόφησης

Σκοπός του πειράματος αυτού είναι να διευρευνηθεί αν μια χημική ουσία προσροφάται σε ένα έδαφος με τρόπο αναστρέψιμο ή μη. Οι πληροφορίες αυτές είναι σημαντικές, γιατί η διεργασία εκρόφησης παίζει και αυτή σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά μιας χημικής ουσίας σε ένα εδαφικό πεδίο. Περαιτέρω, τα δεδομένα εκρόφησης αποτελούν χρήσιμα προς εισαγωγή στοιχεία στη μέσω υπολογιστών σχεδίαση μοντέλων απόπλυσης και προσομοίωση απορροής διαλελυμένων ουσιών. Εφόσον επιθυμείται η διενέργεια μελέτης εκρόφησης, συνιστάται η μελέτη που περιγράφεται κατωτέρω να πραγματοποιείται σε κάθε σύστημα για το οποίο κατέστη δυνατός ο επακριβής προσδιορισμός του K_d στο προηγηθέν πείραμα κινητικής προσρόφησης.

Όπως και στη μελέτη της κινητικής προσρόφησης, υπάρχουν δύο επιλογές για την πραγματοποίηση του πειράματος της κινητικής εκρόφησης: α) η παράλληλη μέθοδος και β) η εν σειρά μέθοδος. Η επιλογή της προς εφαρμογή μεθοδολογίας εναπόκειται στον ερευνητή ο οποίος πρέπει να λαμβάνει υπόψη του τις διαθέσιμες εργαστηριακές εγκαταστάσεις και πόρους.

▼B

α) παράλληλη μέθοδος: για κάθε έδαφος που επιλέγεται να υποβληθεί σε μελέτη εκρόφησης, παρασκευάζονται δείγματα με τον ίδιο λόγο εδάφους/διάλυμα, όσα είναι και τα χρονικά διαστήματα στα οποία επιθυμείται να μελετηθεί η κινητική εκρόφησης. Κατά προτίμηση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα ίδια χρονικά διαστήματα με εκείνα του πειράματος της κινητικής προσρόφησης. Εντούτοις, ο συνολικός χρόνος μπορεί να παραταθεί όσο χρειάζεται ώστε το σύστημα να φθάσει σε ισορροπία εκρόφησης. Σε κάθε πείραμα (ένα έδαφος, ένα διάλυμα) αντιστοιχεί και ένα τυφλό. Το τυφλό συνίσταται από το έδαφος και διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$, χωρίς υπό δοκιμή ουσία, αλλά με το ίδιο βάρος και όγκο, αντίστοιχα, με εκείνα του πειράματος. Στην ίδια διαδικασία δοκιμής υποβάλλεται ως δείγμα-μάρτυρας η υπό δοκιμή ουσία σε διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$ (χωρίς έδαφος). Όλα τα μείγματα του εδάφους με το διάλυμα αναδεύονται μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία προσρόφησης (όπως καθορίστηκε προηγουμένως στο τμήμα 2). Κατόπιν, οι φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση και οι υδατικές φάσεις απομακρύνονται όσο το δυνατό πληρέστερα. Ο όγκος του απομακρυνόμενου διαλύματος αντικαθίσταται από ίσο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ χωρίς υπό δοκιμή ουσία και τα νέα μείγματα αναδεύονται ξανά. Η υδατική φάση του πρώτου σωλήνα ανακτάται όσο το δυνατό πληρέστερα και μετριέται έπειτα από, π.χ., 2 ώρες, εκείνη του δεύτερου σωλήνα έπειτα από 4 ώρες, εκείνη του τρίτου έπειται από 6 ώρες, μέχρις ότου να επιτευχθεί ισορροπία εκρόφησης.

β) εν σειρά μέθοδος: μετά το πείραμα της κινητικής προσρόφησης, το μείγμα φυγοκεντρείται και η υδατική φάση απομακρύνεται κατά το δυνατό πληρέστερα. Ο όγκος του απομακρυνόμενου διαλύματος αντικαθίσταται από ίσο όγκο 0,01 M $CaCl_2$ χωρίς υπό δοκιμή ουσία. Το νέο μείγμα αναδεύεται μέχρις ότου επιτευχθεί ισορροπία εκρόφησης. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, το μείγμα φυγοκεντρείται προς διαχωρισμό των φάσεων. Μικρή ποσότητα της υδατικής φάσης υποβάλλεται αμέσως σε ανάλυση. Κατόπιν, το πείραμα συνεχίζεται με το αρχικό μείγμα. Ο όγκος κάθε επιμέρους ποσότητας θα πρέπει να είναι λιγότερο του 1 % του συνολικού όγκου. Η ίδια ποσότητα πρόσφατου διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ προστίθεται στο μείγμα προς διατήρηση του λόγου εδάφους προς διάλυμα και η ανάδευση συνεχίζεται μέχρι το επόμενο χρονικό διάστημα.

Η ποσοστιαία εκρόφηση υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή (D_{t_i}) ή/και χρονικό διάστημα ($D_{\Delta t_i}$) (ανάλογα με τις ανάγκες της μελέτης) και παρίσταται γραφικώς συνάρτησει του χρόνου. Υπολογίζεται επίσης ο συντελεστής εκρόφησης K_{des} στην κατάσταση ισορροπίας. Όλες οι εξισώσεις που εφαρμόζονται δίδο\ται στο τμήμα «Δεδομένα και έκθεση αναφοράς» και στο προσάρτηιια 5.

Αποτελέσματα από το πείραμα κινητικής εκρόφησης

Με κοινές γραφικές παραστάσεις της ποσοστιαίας εκρόφησης D_{t_i} και προσρόφησης A_{t_i} συναρτήσει του χρόνου είναι δυνατή η εκτίμηση της αναστρεψιμοτητας της διεργασίας προσρόφησης. Εάν η ισορροπία εκρόφησης επιτευχθεί έστω και στο διπλάσιο του χρόνου της ισορροπίας προσρόφησης, και η συνολική εκρόφηση είναι πάνω από το 75 % της προσροφηθείσας ποσότητας, η προσρόφηση θεωρείται ότι είναι αναστρέψιμη.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ**

Τα αναλυτικά στοιχεία παρουσιάζονται με τη μορφή πίνακα (βλέπε προσάρτημα 6). Δίδονται οι επιμέρους μετρήσεις και οι υπολογισθέντες μέσοι όροι. Παρέχονται γραφικές παραστάσεις των ισοθέρμων προσρόφησης. Οι υπολογισμοί πραγματοποιούνται όπως περιγράφεται κατωτέρω.

Για τους σκοπούς της δοκιμής, θεωρείται ότι το βάρος 1 cm^3 υδατικού διαλύματος είναι 1 g. Ο λόγος εδάφους/διάλυμα μπορεί να εκφραστεί σε μονάδες w/w ή w/vol με τον ίδιο αριθμό.

2.1. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ

Ως προσρόφηση (A_{t_i}) ορίζεται η % ποσότητα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας σε σχέση με την ποσότητα που υπήρχε στην αρχή της δοκιμής, υπό τις συνθήκες δοκιμής. Εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι σταθερή και δεν προσ-ροφάται σημαντικά στα τοιχώματα του δοχείου, η A_{t_i} υπολογίζεται σε κάθε χρονική στιγμή η, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i)\cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (3)$$

όπου:

A_{t_i} = ποσοστιαία προσρόφηση τη χρονική στιγμή t_i, (%),

$m_s^{ads}(t_i)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας τη στιγμή t_i, (μg),

m_0 = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο δοκιμαστικό σωλήνα στην αρχή της δοκιμής (μg).

Λεπτομερείς πληροφορίες για τον τρόπο υπολογισμού του ποσοστού προσρόφησης A_{t_i} με την παράλληλη και εν σειρά μέθοδο δίδονται στο προσάρτημα 5.

Συντελεστής κατανομής K_d είναι ο λόγος μεταξύ της συγκέντρωσης της ουσίας στην εδαφική φάση και της κ.ο. συγκέντρωσης της ουσίας στο υδατικό διάλυμα, υπό τις συνθήκες δοκιμής, όταν επιτευχθεί ισορροπία προσρόφησης.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)}\cdot\frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

όπου:

$C_s^{ads}(eq)$ = συγκέντρωση της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας σε ισορροπία προσρόφησης (μg g^{-1}),

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = κ.ό. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε ισορροπία προσρόφησης μg cm^{-3}). Η συγκέντρωση αυτή προσδιορίζεται αναλυτικώς λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές που λαμβάνονται από τα τυφλά,

$m_s^{ads}(eq)$ = μάζα της προσροφηυένης στο έδαφος ουσίας σε ισορροπία προσρόφησης (μg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = μάζα της ουσίας στο διάλυμα σε ισορροπία προσρόφησης (μg),

m_{soil} = ποσότητα της εδαφικής φάσης, εκφρασμένη σε ξηρή μάζα εδάφους (g),

V_0 = αρχικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος (cm^3).

Η σχέση μεταξύ A_{eq} και K_d δίδεται από τον τύπο:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}}\cdot\frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

όπου:

A_{eq} = ποσοστιαία προσρόφηση στην κατάσταση ισορροπίας, %.

Ο τυποποιημένος συντελεστής προσρόφησης οργανικού άνθρακα K_{oc} παρέχει τη σχέση του συντελεστή κατανομής K_d με την περιεκτικότητα του εδαφικού δείγματος σε οργανικό άνθρακα:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad \% \quad (6)$$

οπου:

%OC = ποσοστό οργανικού άνθρακα στο εδαφικό δείγμα (g g^{-1}).

Ο συντελεστής K_{oc} αντιπροσωπεύει μία μοναδική τιμή που χαρακτηρίζει την κατανομή κυρίως μη πολικών οργανικών χημικών ουσιών μεταξύ οργανικού άνθρακα στο έδαφος ή ίζημα και νερό. Η προσρόφηση των χημικών αυτών ουσιών σχετίζεται με το οργανικό περιεχόμενο του ροφούντος στερεού (7). Έτσι, οι τιμές K_{oc} εξαρτώνται από τα ειδικά χαρακτηριστικά του χουμικών κλασμάτων που διαφέρουν σημαντικά στη ροφητική ικανότητα, λόγω διαφορών στην προέλευση, τη γένεση, κ.λπ.

2.1.1. **Ισόθερμοι προσροφήσεως**

Η εξίσωση των ισόθερμων προσροφήσεως Freundlich σχετίζει την ποσότητα της προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα κατά την ισορροπία (εξίσωση 8).

Η επεξεργασία των στοιχείων γίνεται όπως και στην ενότητα «Προσρόφηση» και, για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, υπολογίζεται η συγκέντρωση της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας μετά τη δοκιμή προσρόφησης [C_s^{ads}(eq) αλλού δηλούμενη ως x/m). Υποτίθεται ότι έχει επιτευχθεί ισορροπία και ότι το C_s^{ads}(eq) αντιπροσωπεύει την τιμή ισορροπίας:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right].V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Η εξίσωση προσρόφησης Freundlich αντιπροσωπεύεται από τον τύπο (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

ή με τη γραμμική μορφή:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

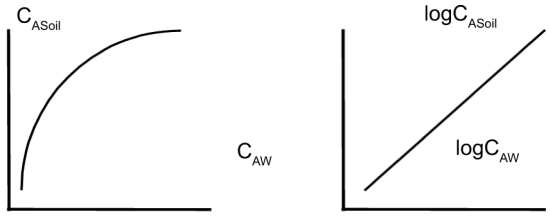
όπου:

K_F^{ads} = συντελεστής προσρόφησης Freundlich. Οι διαστάσεις του είναι $cm^3\ g^{-1}$ μόνον εφόσον 1/n = 1. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, στις διαστάσεις του εισέρχεται και το K_F^{ads} ($\mu g^{1—1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$)

n = σταθερά αναγωγής. Το 1/n κυμαίνεται εν γένει μεταξύ 0,7-1,0, δείχνοντας ότι τα δεδομένα ροφήσεως είναι συχνά ελαφρώς μη γραμμικά.

Οι εξισώσεις (8) ανδ (9) παρίστανται γραφικώς και οι τιμές των K_F^{ads} και 1/η υπολογίζονται με ανάλυση αναγωγής χρησιμοποιώντας την εξίσωση 9. Υπολογίζεται επίσης ο συντελεστής συσχέτισης r^2 της λογαριθμικής εξισώσεως. Παράδειγμα τέτοιων καιιπυλών δίδεται στην εικόνα 2.

▼B



Εικόνα 2. Καμπύλη προσρόφησης Freundlich, κανονική και γραμμική

2.1.2. **Υπόλοιπο μάζας**

Ως υπόλοιπο μάζας (MB) ορίζεται το εκατοστιαίο ποσοστό της ουσίας που μπορεί να ανακτηθεί με αναλυτικά μέσα έπειτα από δοκιμή προσρόφησης συναρτήσει της ονομαστικής ποσότητας της ουσίας στην αρχή της δοκιμής.

Η επεξεργασία των στοιχείων διαφέρει εάν ο διαλύτης είναι πλήρως αναμείξιμος με νερό. Στην περίπτωση υδατοανα-μείξιμου διαλύτη, για τον προσδιορισμό της ποσότητας της ουσίας που ανακτάται με εκχύλιση με διαλύτη, μπορεί να εφαρμοστεί η επεξεργασία των στοιχείων που περιγράφεται στο κεφάλαιο «Εκρόφηση». Εάν ο διαλύτης είναι λιγότερο αναμείξιμος με νερό, πρέπει να γίνεται προσδιορισμός της ποσότητας.

Το υπόλοιπο μάζας MB για την προσρόφηση υπολογίζεται ως εξής: υποτίθεται ότι ο όρος (m_E) αντιστοιχεί στο άθροισμα των χημικών μαζών που εκχυλίζονται από το έδαφος και την επιφάνεια του δοκιμαστικού δοχείου με οργανικό διαλύτη:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \qquad (10)$$

οπου:

MB = υπόλοιπο μάζας (%),

m_E = ολική μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που εκχυλίζεται από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοκιμαστικού δοχείου σε δύο στάδια (μg),

C_0 = αρχική κ. ό. συγκέντρωση του υπό δοκιμή διαλύματος σε επαφή με το έδαφος μg cm^{-3}),

V_{rec} = όγκος του υπερκειμένου που ανακτάται μετά την ισορροπία προσρόφησης (cm^{-3}).

2.2. ΕΚΡΟΦΗΣΗ

Ως εκρόφηση (D) ορίζεται το ποσοστό της υπό δοκιμή ουσίας που εκροφάται σε σχέση με την προηγουμένως προσ-ροφηθείσα ποσότητα ουσίας, υπό τις συνθήκες δοκιμής:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

όπου:

D_{t_i} = ποσοστό εκρόφησης τη χρονική στιγμή t_i, (%),

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = μάζα της εκροφημένης από το έδαφος υπό δοκιμή ουσίας τη χρονική στιγμή t_i μg)

$m_s^{des}(eq)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας κατά την ισορροπία προσρόφησης (μg).

Λεπτομερείς πληροφορίες για τον τρόπο υπολογισμού του ποσοστού εκρόφησης D_{ti} στην παράλληλη και εν σειρά μέθοδο δίδονται στο προσάρτημα 5.

Φαινόμενος συντελεστής εκρόφησης (K_{des}), υπό τις συνθήκες δοκιμής, είναι η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της ουσίας που παραμένει στην εδαφική φάση και της κ.ό. συγκέντρωσης της εκροφημένης ουσίας στο υδατικό διάλυμα, όταν επιτευχθεί ισορροπία εκρόφησης:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)\ V_T}{m_{aq}^{des}(eq) \qquad m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \tag{12}$$

όπου:

K_{des} = συντελεστής εκρόφησης ($cm^3\ \gamma^{-1}$).

$m_{aq}^{des}(eq)$ = συνολική μάζα της εκροφημένης από το έδαφος ουσίας στην ισορροπία εκρόφησης, (μg),

V_T = συνολικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος κατά τη διάρκεια της δοκιμής κινητικής εκρόφησης (cm^3).

Οδηγίες για τον υπολογισμό της $m_{aq}^{des}(eq)$ δίδονται στο προσάρτημα 5 υπό τον τιτλο «Εκρόφηση».

Παρατήρηση:

Εάν η προηγηθείσα δοκιμή προσρόφησης εκτελέστηκε με την παράλληλη μέθοδο, ο όγκος V_T στην εξίσωση (12) θεωρείται ότι είναι ίσος με V_0.

2.2.1. **Ισόθερμοι εκρόφησης**

Η εξίσωση των ισοθέρμων εκρόφησης Freundlich δίδει την υπάρχουσα σχέση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης (εξίσωση 16).

Για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, η συγκέντρωση της ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης υπολογίζεται ως εξής:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \tag{13}$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ ορίζεται ως:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A}(\mu g) \tag{14}$$

όπου:

$C_s^{des}(eq)$ = συγκέντρωση της υπό δοκιμής ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης (μg g^{-1});

$m_m^{des}(eq)$ = μάζα ουσίας που προσδιορίζεται αναλυτικώς στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης

▼B

m_{aq}^{A} = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που περισσεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης (μg),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = μάζα της ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_r^F = όγκος του διαλύματος που παραλαμβάνεται από το σωλήνα για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης (cm^3);

V_R = όγκος του υπερκείμενου υγρού που απομακρύνεται από το σωλήνα μετά την επίτευξη ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται από το ίδιο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$(cm^3).

Η εξίσωση εκρόφησης Freundlich δίνεται από τον τύπο (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

με γραμμική μορφή:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

όπου:

K_F^{des} = συντελεστής εκρόφησης Freundlich,

n = σταθερά αναγωγής,

$C_{aq}^{des}(eq)$ = κ.ό. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας εκρόφησης μg cm^{-3}).

Οι εξισώσεις 16 και 17 μπορούν να παρασταθούν γραφικώς και οι τιμές των και K_F^{des} 1/n υπολογίζονται με ανάλυση αναγωγής χρησιμοποιώντας την εξίσωση 17.

Παρατήρηση:

Εάν ο εκθέτης προσρόφησης η εκρόφησης Freundlich 1/n είναι ίσος με 1. οι σταθερές συνδέσεως προσρόφησης ή εκρόφησης Freundlich (και) θα είναι ίσες με τις σταθερές ισορροπίας προσρόφησης ή εκρόφησης (K_F^{ads} και K_F^{des}) αντιστοίχως, και οι καμπύλες των C_S εναντι C_{aq} θα είναι γραμμικές. Εάν οι εκθέτες δεν είναι ίσοι με 1. οι καμπύλες των C_b έναντι C_{aq} δεν θα είναι γραμμικές και ο; σταθερές προσρόφησης και εκρόφησης θα διαφέρουν κατά μήκος των ισοθέρμων.

2.2.2. **Έκθεση δοκιμής**

Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

— η πλήρης ταυτότητα των χρησιμοποιηθέντων εδαφικών δειγμάτων συμπεριλαμβανομένων:

— του γεωγραφικού εντοπισμού της τοποθεσίας (γεωγραφικό πλάτος και μήκος),

— της ημερομηνίας δειγματοληψίας,

▼B

— του προτύπου χρήσεως (π.χ. γεωργικό έδαφος, δάσος, κ.λπ.),

— του βάθους δειγματοληψίας,

— της περιεκτικότητας σε άμμο/προσχωσιγενή/άργιλο,

— των τιμών pH (σε 0,01 M $CaCl_2$),

— της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα,

— της περιεκτικότητας σε οργανική ύλη,

— της περιεκτικότητας σε άζωτο,

— της σχέσης C/N,

— της κατιοανταλλακτικής ικανότητας (mmol/kg),

— κάθε στοιχείου σχετικού με τη συλλογή και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων,

— όπου χρειάζεται, κάθε σχετικού στοιχείου για την ερμηνεία της προσρόφησης-εκρόφησης της υπό δοκιμή ουσίας,

— αναφοράς των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό κάθε παραμέτρου,

— πληροφορίες για την υπό δοκιμή ουσία, όπου απαιτείται,

— η θερμοκρασία των πειραμάτων,

— οι συνθήκες φυγοκέντρησης,

— η αναλυτική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας,

— αιτιολόγηση της τυχόν χρήσεως διαλυτοποιητικού μέσου για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας,

— επεξηγήσεις για τις τυχόν διορθώσεις που έγιναν στους υπολογισμούς,

— δεδομένα σύμφωνα με το έντυπο (προσάρτημα 6) και γραφικές παραστάσεις,

— κάθε πληροφορία και παρατήρηση που είναι χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045. Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L. (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate. Italy, 1 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention. Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines. OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), «Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils», in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), «Adsorption-Desorption Phenomena» in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), «An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media». Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), pp. 29-3 5.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), «Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis», in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), «Movement and sorption of chemicals applied to the soil». Weeds, 13, pp. 185-190.

(18) Rhodes R. C, Belasco 1.]., and Pease H. L., (1970) «Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils». J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M. PL, (1995), «Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil» in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), «Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides», IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

▼B

(21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), «Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils». Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967). «Persistence of herbicides in soil». J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), «Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1.3,5-triazinc herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption». Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth). A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), «Effect of adsorption, mowement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides». Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J. M., (1973). «Process affecting herbicide action in soil». Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden'. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J. W., (1975), «The interpretation of soil leaching experiments», in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172. Plenum Press, NY.

(28) Helling C. S., (1971), «Pesticide mobility in soils». Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J. W., (1972). «Diffusion and volatilization» in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds). Vol. I. pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), «Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system». Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M.. Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), «Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide teachability». J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357,

(33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). «Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils». J. of Soil Sci., 28, pp. 340-350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), «Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils». Pest. Sci., 11, pp. 389-395.

(35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), «Sorption estimates for modeling», in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101,

(36) Lambert S. M., (1967), «Functional relationship between sorption in soil and chemical structure». J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼B

(37) Hance R. J., (1969), «An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils». J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G. G. (1969), «Molecular structure of herbicides and their sorption by soils». Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G. (1981). «Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor». J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (I984), «Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology». J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), «Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil». Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg., (1968), Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), «Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners». Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), «Adsorption in organic chemicals» in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring CAI. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli]., and Warren G. F., 1971, «Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils». Weed Sci. 19: pp. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson]. M. and Santelmann, (1975), «Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils». Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), «Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations» in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), «Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase», CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F.. and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag. Stuttgart (1982). 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. «Methods of Soil Analysis», Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils,

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), «Precision in pesticide adsorption measurements». Soil Sci. Am. Proc, 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), «Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine». Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J. J. T. I, «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system». Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J. J. T. I. «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106». Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide]., Cantier J. M., et Coste C., (1980), «Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique». Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), «Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments». J. Environ.QuaL, 10(3), pp. 382-386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), «Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water». Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), «Sorption of organic substances by soils and sediments». J. Environm. Sci. Health. B19 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C, (1987), «Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons». Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W. J. , Reehl W. F. and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). «Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota» in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), Ά physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds'. Science, Vol. 206, pp. 831-832.

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C, (1981), «Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption». Soil Sci. Soc. Am.]. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R.. (1981), «Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilite-reactivite». Revue de l'Agric, 34 (4), pp. 319-322.

(74) Müller M., Kordel W. (1996), «Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil». Chemosphere, 32(12). pp. 2493-2504.

(75) Kordel \V., Kotthoff G.. Müller M. (1995). «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test». Chemosphere 30 (7), pp. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases». Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R. J., (1967), «The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Invoking Herbicides». Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W. C., and Harper S. S., (1990), «The retention processes: mechanisms» in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), «Interpretation and use of sorption isotherms» in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), «Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils». J. Chem. Soc, pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C, (1980), «Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caracteristiques générales de l'adsorption». Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), «Anomalies in the Freundlich equation», Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

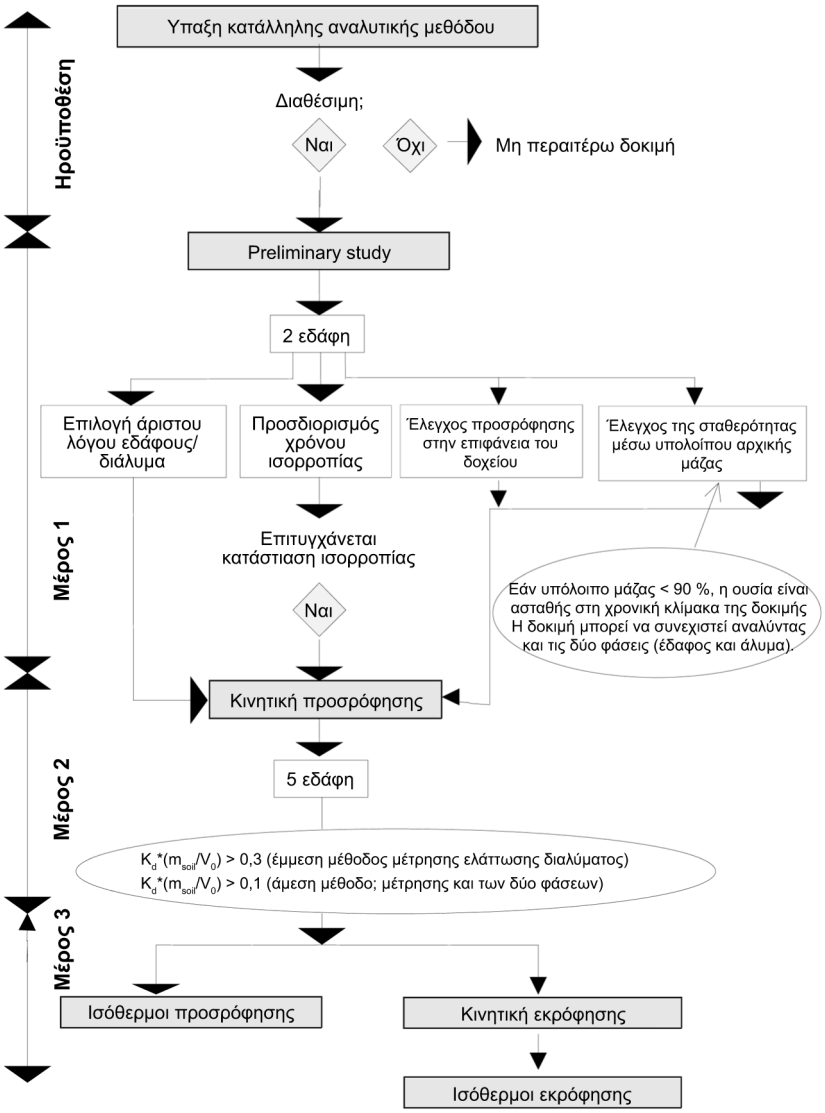
(84) Guth, J. A., (1985), Adsorption/desorption', in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼**B**

Προσαρτημα 1

Σχήμα δοκιμής



▼B

Προσαρτημα 2

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ

Από τον πίνακα που ακολουθεί (84) καθίσταται προφανές ότι όταν η διαφορά μεταξύ της αρχικής μάζας (m_0 = 110 μg) και της μάζας ισορροπίας [$m_{aq}^{ads}(eq)$ = 100 μg] της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα είναι πολύ μικρή, σφάλμα 5 % στη μέτρηση της συγκέντρωσης ισορροπίας απολήγει σε σφάλμα 50 % στον υπολογισμό της συγκέντρωσης της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας [$m_s^{ads}(eq)$] και 52,4 % στον υπολογισμό του K_d.

Ποσότητα εδάφους m_{soil} = 10 g

Όγκος διαλύματος V_0 = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (μg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (μg cm^{3})	R	$m_s^{ads}(eq)$* (μg)	$C_s^{ads}(eq)$* (μg g^1)	R‡	K_d*	R‡
	ΓΙΑ A = 9 %							
m_0 = 110 μg ή C_0 = 1,100 μg/cm^3	100	1 000	αληθής τιμή	10	1,00	αληθής τιμή	ι	
	101	1 010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	103	1 050	5 %	3	0,50	30 %	0,476	52,4 %
	109	1 090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	ΓΙΑ A = 55 %							
m_0 = 110 μg ή C_0 = 1,100 μg/cm^3	50,0	0,500	αληθής τιμή	60,0	60,0	αληθής τιμή	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	55,0	8,3 %	10,00	16,7 %
	ΓΙΑ A = 99 %							
m_0 = 110 μg ή C_0 = 1,100 μg/cm^3	1,100	0,011	αληθής τιμή	108,9	10,89	αληθής τιμή	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq),\ C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}} \cdot Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στην εδαφική φάση εν ισορροπία, μg,

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση εν ισορροπία, μg,

$C_s^{ads}(eq)$ = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην εδαφική φάση εν ισορροπία, μg g^{-1};

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = κ.ο. συγκέτρωση της υπό δοκιμή ονσίας στην υδατική φάση εν ισορροπία, μg cm^{-3};

R = αναλυτικό σφάλμα στον προσδιορισμό της $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = υπολογισθέν σφάλμα λόγω του αναλυτικού σφάλματος R.

▼B

Προσαρτημα 3

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΟΥ K_d

1. Οι τεχνικές εκτίμησης επιτρέπουν την πρόβλεψη του K_d με βάση συσχετισμούς με, π.χ., τιμές P_{ow} (12) (39) (63-68), δεδομένα υδατοδιαλυτότητας (12) (19) (21) (39) (68-73), ή δεδομένα πολικότητας προερχόμενα από εφαρμογή HPLC ανάστροφης φάσης (74-76). Όπως φαίνεται στους πίνακες 1 και 2, από τις εξισώσεις αυτές υπόλογίζονται οι K_{oc} ή K_{om} και στη συνέχεια, εμμέσως, ο K_d από τις εξισώσεις:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} (cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} (cm^3 g^{-1})$$

2. Η ιδέα αυτών των συσχετισμών βασίζεται σε δύο παραδοχές: 1. η προσρόφηση μιας ουσίας επηρεάζεται κυρίως από την οργανική ύλη του εδάφους και 2. οι εμφανιζόμενες αλληλεπιδράσεις είναι κυρίως μη πολικές. Ως εκ τούτου, οι συσχετισμοί αυτοί: 1. δεν εφαρμόζονται, ή εφαρμόζονται μόνο σε κάποιο βαθμό, σε πολικές ουσίες και 2. δεν εφαρμόζονται σε περιπτώσεις όπου η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ύλη είναι πολύ μικρή (12). Επιπλέον, αν και μεταξύ P_{0w} και προσρόφησης (19) βρέθηκαν ικανοποιητικοί συσχετισμοί, δεν μπορούμε να πούμε το ίδιο για τη σχέση μεταξύ υδατοδιαλυτότητας και βαθμού προσρόφησης (19) (21). Μέχρι τώρα, οι διάφορες μελέτες έχουν αποδειχθεί πολύ αντιφατικές.

3. Ορισμένα παραδείγματα συσχετισμών μεταξύ του συντελεστή προσρόφησης και του συντελεστή κατανομής οκτα-νόλης-νερού, καθώς επίσης και της υδατοδιαλυτότητας δίδονται στους πίνακες 1 και 2, αντιστοίχως.

Πίνακας 1.

Παραδείγματα συσχετισμών μεταξύ συντελεστή κατανομής προσρόφησης και συντελεστή κατανομής οκτα-νόλης-νερού. Για περαιτέρω παραδείγματα, βλέπε (12) (68)

Ουσίες	Συσχετισμοί	Συγγραφείς
Υποκατεστημένες ουρίες	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$.	Briggs (1981) (39)
Αρωματικές χλωριωμένες ενώσεις	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Διάφορα γεωργικά φάρμακα	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl και Mingelgrin (1984) (66)
Αρωματικοί υδρογονάνθρακες	$\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles και Mantoura (1987) (67)

Πίνακας 2.

Παραδείγματα συσχετισμών μεταξύ του συντελεστή κατανομής προσρόφησης και υδατοδιαλυτότητας. Για περαιτέρω παραδείματα, βλέπε (68) (69)

Ενώσεις	Συσχετισμοί	Συγγραφείς
Διάφορα γεωργικά φάρμακα	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl και Mingelgrin (1984) (66)
Αλειφατικές, αρωματικές χλωριωμένες ενώσεις	$\log K_{om} = (4,040 +/- 0,038) - (0,557 +/- 0,012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α-ναφθόλη	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Κυκλικές, αλειφατικές αρωματικές ενώσεις	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Διάφορες ενώσεις	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Προσαρτημα 4

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ

1. Ο χρόνος φυγοκέντρησης δίνεται από τον ακόλουθο τύπο, υποτιθεμένου ότι τα σωματίδια είναι σφαιρικά:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln\left(R_b/R_t\right) \qquad (1)$$

Για απλουστευτικούς λόγους, όλες οι παράμετροι εκφράζονται σε μονάδες SI (g, cm).

όπου:

ω = ταχύτητα περιστροφής (= π rpm/60), rad s^{-1},

rpm = στροφές ανά λεπτό,

η = ιξώδες διαλύματος, g s^{-1} cm^{-1},

r_p = ακτίνα σωματιδίων, cm,

ρ_s = πυκνότητα εδάφους, g cm^{-3},

ρ_{aq} = πυκνότητα διαλύματος, g cm,

R_t = απόσταση από το κέντρο του στροφείου της φυγοκέντρου μέχρι την άνωεπιφάνεια του διαλύματος στο σωλήνα φυγοκέντρησης, cm,

R_b = απόσταση από το κέντρο του στροφείου της φυγοκέντρου μέχρι τον πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρησης, cm,

R_b-R_t = μήκος του μείγματος εδάφους|διαλύματος στο σωλήνα φυγοκέντρησης, cm.

Στην πράξη, για να διασφαλιστεί πλήρης διαχωρισμός, χρησιμοποιούνται διπλάσιοι από τους υπολογιζόμενους χρόνους.

2. Η εξίσωση (1) μπορεί να απλοποιηθεί περαιτέρω αν θεωρήσουμε το ιξώδες (η) και την πυκνότητα (ρ_{aq}) του διαλύματος ως ίσα με το ιξώδες και την πυκνότητα του νερού στους 25 ºC. Έτσι, η = 8,95 × 10 $^{-3}$ g s^{-1} φμ^{-1} και ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3}.

Τότε, ο χρόνος φυγοκέντρησης δίνεται από την εξίσωση ():

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p^2(\rho_s - l)} \ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Από την εξίσωση 2 καθίσταται προφανές ότι για τον ορισμό των συνθηκών φυνοκέντρησης, δηλαδή του χρόνου (t) και της ταχύτητας (rpm), προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός σωματιδίων με συγκεκριμένο μέγεθος (στην περίπτωση μας 0,1 urn ακτίνα), δύο παράμετροι παίζουν σημαντικό ρόλο: 1. η πυκνότητα του εδάφους και . το μήκος του μείγματος στο σωλήνα φυγοκέντρησης (R_b-R_t). δηλαδή η απόσταση που καλύπτει ένα σωματίδιο εδάφους από την άνω επιφάνεια του διαλύματος μέχρι τον πυθμένα του σωλήνα. Προφανώς, νια συγκεκριμένο όγκο, το μήκος του μείγματος στο σωλήνα εξαρτάται από το τετράγωνο της ακτίνας του σωλήνα.

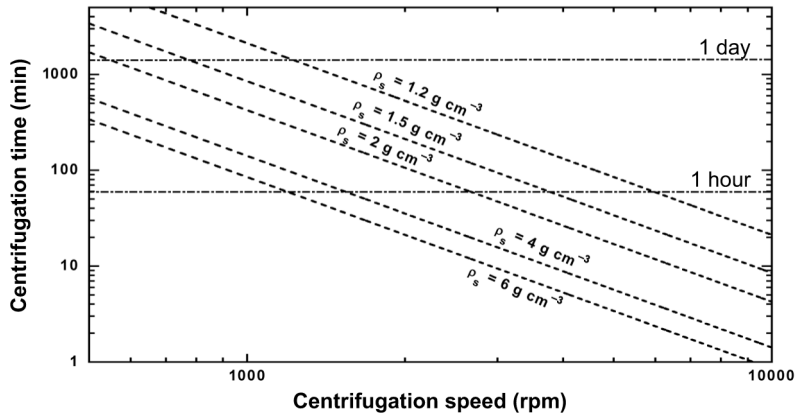
4. Στην εικόνα 1 παρίστανται οι μεταβολές του χρόνου φυγοκέντρησης (Ο συναρτήσει της ταχύτητας φυγοκέ\τρησης (rpm) νια διάφορες πυκνότητες εδάφους (p_s) (εικόνα Ια) και διάφορα μήκη του μείγματος στους σωλήνες φυγοκέντρησης (εικόνα 1 β). Από την εικόνα 1 α είναι εμφανης η επίδραση της εδαφικής πυκνότητας. Για παράδειγμα, για μία κλασική φυνοκέντρηση 3000 rpm ο χρόνος ουγοκεντρησης είναι περίπου 240 min για εδαφική πυκνότητα 1,2 g cm^3, ενώ για 2,0 g cm^3 είναι μόνον 50 min. μοιως, από την εικόνα 1β, για μία κλασική συγοκέντρηση 3000 rpm ο χρόνος συνοκέντρησης είναι περίπου 50 min νια μήκος μείγματος 10 cm και μόνον 7 min για μήκος 1 cm. Ε\τούτοις, παίζει σημαντικό ρολό το να βρεθεί η αρίστη σχέση μεταξύ φυγοκέντρησης που απαιτεί το λιγότερο δυνατό μήκος και εύκολου χειρισμού για τον ερευνητή στο διαχωρισμό των φάσεων μετά τη φυγοκέντρηση.

▼B

5. Περαιτέρω, όταν ορίζονται οι πειραματικές συνθήκες για το διαχωρισμό των φάσεων εδάφους/διαλύματος, είναι σημαντικό να εξεταστεί η πιθανή ύπαρξη μιας τρίτης «ψευδοφάσεως», των κολλοειδών. Τα σωματίδια αυτά, με μέγεθος μικρότερο από 0,2 μm, μπορεί να έχουν σημαντική επίπτωση στον όλο μηχανισμό προσρόφησης μιας ουσίας σε ένα εδαφικό εναιώρημα. Όταν εκτελείται φυγοκέντρηση όπως περιγράφεται ανωτέρω, τα κολλοειδή παραμένουν στην υδατική φάση και υποβάλλονται σε ανάλυση μαζί με την υδατική φάση. Έτσι, χάνονται οι πληροφορίες για την επίπτωσή τους.

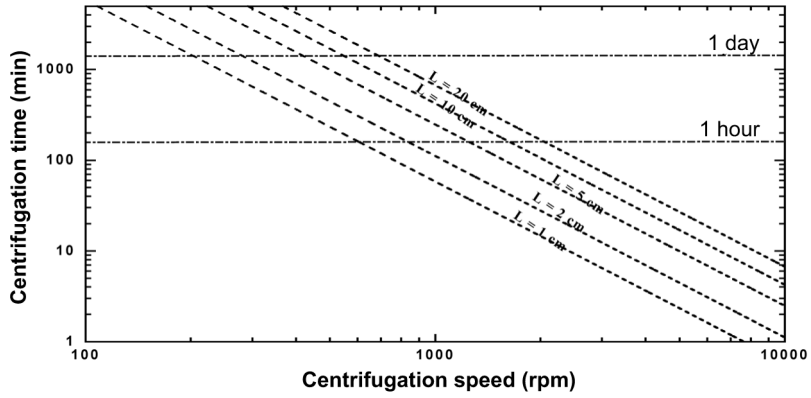
   Εάν το εργαστήριο διαθέτει εξοπλισμό υπερφυγοκένιρησης ή υπερδιήθησης, η προσρόφηση/εκρόφηση μιας ουσίας στο έδαφος μπορεί να μελετηθεί περισσότερο σε βάθος, συμπεριλαμβανομένων και στοιχείων για την προσρόφηση της ουσίας στα κολλοειδή. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να εφαρμόζεται υπερφυγοκέ\τρηση με 60 000 rpm/min ή υπερδιήθηση με πορώδες φίλτρου 100 000 Daltons για το διαχωρισμό των τριών φάσεων, έδαφος, κολλοειδή και διάλυμα. Το πρωτόκολλο δοκιμής θα πρέπει επίσης να τροποποιείται αναλόγως, ώστε και οι τρεις φάσεις να υποβληθούν σε ανάλυση για την ουσία.

Εικόνα 1α.



Μεταβολές χρόνου φυγοκέντρησης (υ) συναρτήσει της ταχύτητας φυγοκέντρησης (rpm) για διάφορες πυκνότητες εδάφους (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b -R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g $s^{-1}cm^{-1}$ και ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} στους 25 °C.

Εικόνα 1β.



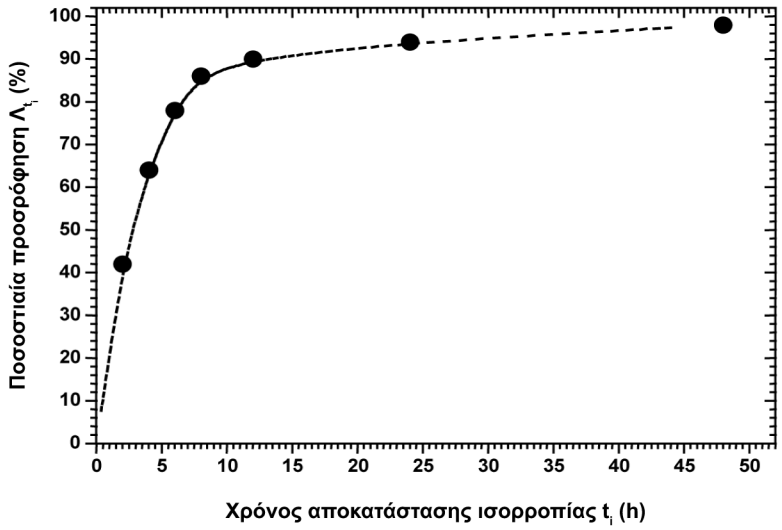
Μεταβολές του χρόνου φυγοκέντρησης (t) συναρτήσει της ταχύτητας φυγοκέ\τρηοης (rpm) για διάφορα μήκη του μείγματος στο σωλήνα φυγοκεντρησης (Rb -Rt) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g $s^{-1}cm^{-1}$, ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} at 25 °C και ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

Προσαρτημα 5

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ A (%) ΚΑΙ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ D (%)

Το χρονικό σχήμα της διαδικασίας είναι:



Για όλους τους υπολογισμούς, υποτίθεται ότι η υπό δοκιμή ουσία είναι σταθερή και δεν προσροφάται σε μεγάλο βαθμό στα τοιχώματα του δοχείου.

ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ A (A%)

α) *Παράλληλη μέθοδος*

Η ποσοστιαία προσρόφηση υπολογίζεται για κά9ε δοκιμαστικό σωλήνα (i) σε κάθε χρονική στιγμή (t_i), σύμφωνα με την εξίσωση:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Οι όροι της εξίσωσης αυτής μπορούν να υπολογιστούν ως εξής:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

όπου:

A_{t_i} = ποσοστιαία προσρόφηση (%) τη χρονική στιγμή t_i;

$m_s^{ads}(t_i)$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος τη χρονική στιγμή t_i που εκτελείται η ανάλυση (μg),

m_0 = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο δοκιμαστικό σωλήνα, στην αρχή της δοκιμής (μg),

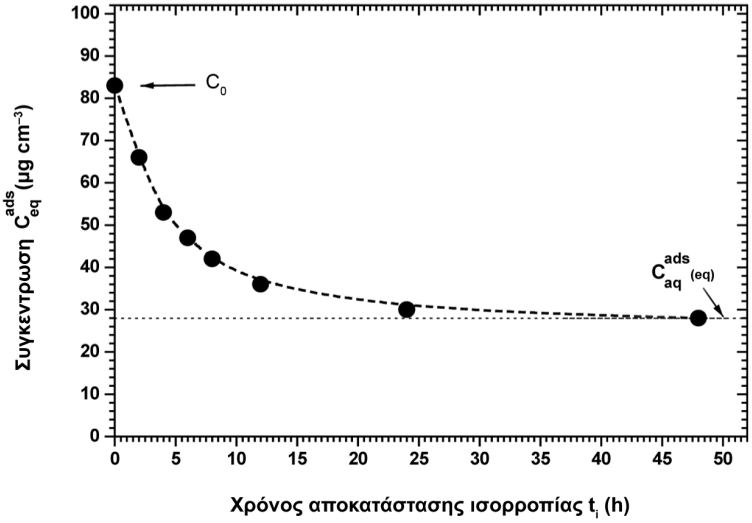
C_0 = αρχική κ.ό. συγκέντρωση του υπό δοκιμή διαλύματος που είναι σε επαφή με το έδαφος (μg cm^{-3});

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = κ.ό. συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση τη χρονική στιγμή t_i κατά την οποία εκτελείται η ανάλυση (μg cm^{-3}). Η συγκέντρωση αυτή προσδιορίζεται αναλυτικώς λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές που βρέθηκαν στα τυφλά,

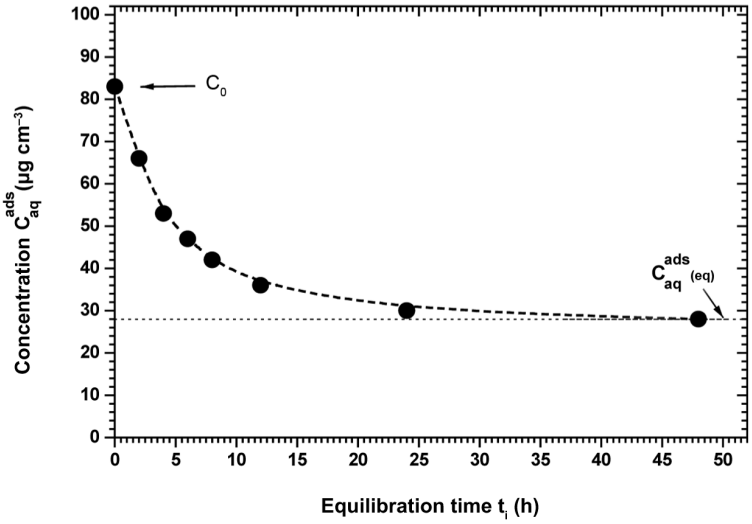
V_0 = αρχικός όγκος του υπό δοκιμή διαλύματος σε επαφή με το έδαφος (cm^3).

Οι τιμές του ποσοστού προσρόφησης A_{t_i} ή $C_{aq}^{ads}(t_i)$ παριστάνονται γραφικώς συναρτήσει του χρόνου και προσδιορίζεται ο χρόνος μετά τον οποίο επιτυγχάνεται ισορροπία ρόφησης. Παραδείγματα τέτοιων καμπυλών εμφαίνονται στις εικόνες 1 και 2 αχτιστοίχως.



Εικόνα 1.

Καμπύλη ισορροπίας προσρόφησης



Εικόνα 2.

Κ.ό. συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση (C_{aq}) συναρτήσει του χρόνου

▼B

β) *Εν σειρά μέθοδος*

Στις εξισώσεις που ακολουθούν λαμβάνεται υπόψη ότι η διαδικασία προσρόφησης εκτελείται με μετρήσεις της υπό δοκιμή ουσίας σε μικρές ποσότητες της υδατικής φάσης σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα

— Κατά τη διάρκεια κάθε χρονικού διαστήματος, η ποσότητα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας υπολογίζεται ως εξής:

— για το πρώτο χρονικό διάστημα $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— νια το δεύτερο χρονικό διάστημα $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— για το τρίτο χρονικό διάστημα $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— για το νιοστό χρονικό διάστημα $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Το ποσοστιαία προσρόφηση σε κάθε χρονικό διάστημα, $A_{\Delta t_i}$, υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)\ (1)$$

ενώ το ποσοστιαία προσρόφηση A_{t_i} τη χρονική στιγμή t_i δίνεται από την εξίσωση:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)\ (1)$$

Οι τιμές της προσρόφησης A_{t_i} ή $A_{\Delta t_i}$ (ανάλογα με τις ανάγκες της μελέτης) παριστάνονται γραφικώς συναρτήσει του χρόνου και προσδιορίζεται ο χρόνος μετά τον οποίο επιτυγχάνεται ισορροπία ρόφησης.

— Κατά το χρόνο ισορροπίας t_{eq}:

— η μάζα της προσροφημένης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας είναι:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)(1)$$

(1) Εξισωσεις εφαρμαξόμενες τόσο στην άμεση όσο και στην έμμεση μέθοδο. Όλες οι υπόλοιπες εξισώσεις εωαρμόζονται μόνον στην έμμεση μέθοδο.

▼B

— η μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στο διάλυμα είναι:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)(1)$$

— και το ποσοστιαία προσρόφηση στην ισορροπία είναι:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)(1)$$

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται παραπάνω ορίζονται ως:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), ..., m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας κατά τη διάρκεια των χρονικών δια - στημάτων Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} αντιστοίχως (μg),

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), ..., m_n^{ads}(t_n)$ = μάζα της ουσίας που μετριέται σε όγκο v_a^A τις χρονικές στιγμές t_1, t_2,t_n αντιστοίχως (μg),

$m_s^{ads}(eq)$ = μάζα της προσροφημένης στο έδαφος ουσίας κατά την ισορροπία προσρόφησης (μg).

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = μάζα της ουσίας στο διάλυμα κατά την ισορροπία προσρόφησης (μg),

v_a^A = όγκος της ποσότητας στην οποία μετριέται η υπό δοκιμή ουσία (cm^3),

$A_{\Delta t_i}$ = ποσοστιαία προσρόφηση που αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα Δt_i (%),

A_{eq} = ποσοστιαία προσρόφηση κατά την ισορροπία προσρόφησης, (%).

ΕΚΡΟΦΗΣΗ D (%)

Ως χρόνος εκκίνησης του πειράματος κινητικής εκρόφησης t_0 λαμβάνεται η χρονική στιγμή κατά την οποία ο μέγιστος ανακτημένος όγκος του διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας (μετά την επίτευξη ισορροπίας προσρόφησης) αντικαθίσταται από ίσο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$.

α) *Παράλληλη μέθοδος*

Τη χρονική στιγμή t_i, μετριέται η μάζα της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση που λαμβάνεται από το σωλήνα i (V_r^i), και η προσροφημένη μάζα υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i} \right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

Κατά την ισορροπία εκρόφησης $t_i = t_{eq}$ και συνεπώς $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

Η μάζα της προσροφουμένης υπό δοκιμή ουσίας κατά τη χρονική περίοδο (Δt_i) δίνεται από την εξίσωση:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Η ποσοστιαία εκρόφηση υπολογίζεται:

τη χροηκή στιγμή t_i από την εξίσωση:

(1) Εξισωσεις εφαρμαξόμενες τόσο στην άμεση όσο και στην έμμεση μέθοδο. Όλες οι υπόλοιπες εξισώσεις εωαρμόζονται μόνον στην έμμεση μέθοδο.

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

και κατά τη διάρκεια χρονικού διαστήματος (Δt_i) από την εξίσωση:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

όπου:

D_{t_i} = ποσοστιαία εκρόφηση τη χρονική στιγμή t_i (%),

$D_{\Delta t_i}$ = ποσοστιαία εκρόοηση που αντιστοιχεί σε χρονικό διάστηια Δt_i (%),

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = μάζα της προσροφημένης υπό δοκιμή ουσίας τη χρονική στιγμή t_i, (μg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = μάζα της προσροφουμένης υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια χρονικού διαστήματος Δt_i (μg),

$m_m^{des}(t_i)$ = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που ανευρίσκεται αναλυτικώς τη χρονική στιγμή t_i σε όγκο διαλύματος V_r^i που λαμβάνεται για ανάλυση, (μg),

m_{aq}^{A} = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που περισσεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης, (μg):

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = μαία της υπο δοκιμή ουσίας στο διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης (μg),

V_R = όγκος του υπερκειμένου υγρού που απομακρύνεται απο το σωλήνα μετά την αποκατάσταση ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται απο τον ίδιο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ solution (cm^3).

$\dot{V}_r$ = όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα (f) για τη μέτρησης της υπό δοκιμή ουσίας στο πείραμα της κινητικής εκρόφησης (cm^3).

Οι τιμές εκρόφησης D_{t^i} or $D_{\Delta t^i}$ (ανάλογα με τις ανάγκες της μελέτης) παρίστανται γραφικώς συναρτήσει του χρόνου και προσδιορίζεται ο χρόνος μετά τον οποίο αποκαθίσταται ισορροπία εκρόψησης.

β) *Εν σειρά μέθοδος*

Στις εξισώσεις που ακολουθούν λαμβάνεται υπόψη ότι η διαδικασία προσρόφησης, που προηγήθηκε, πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας σε μικρές ποσότητες (v_a^A) της υδατικής φάσης (εν σειρά μέθοδος στην ενότητα «Εκτέλεση της δοκιμής» 1.9.). Υποτίθεται ότι: α) ο όγκος του υπερκείμενου υγρού που απομακρύνθηκε από το σωλήνα μετά το πείραμα κινητικής εχρόφησης αντικαταστάθηκε από τον ίδιο όγκο διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$ solution (V_R) και β) ο συνολικός όγκος της υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος (V_T) κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης παραμένει σταθερός και δίνεται από την εξίσωση:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

Τη χρονική στιγμή t_i:

— Σε μικρή ποσότητα (v_a^D) μετριέται η μάζα της υπό δοκιμή ουσίας και η προσροφημένη μάζα υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— Κατά την ισορροπία εκρόφησης $t_i = t_{eq}$ και συνεπώς $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— Η ποσοστιαία εκρόφηση D_{t_i} υπολογίζεται με την ακόλουθη εξίσωση:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Σε χρονικό διάστημα (Δt_i):

Κατά τη διάρκεια κάθε χρονικού διαστήματος η ποσότητα της εκροφουμένης ουσίας υπολογίζεται ως εξής:

— το πρώτο χρονικό διάστημα $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \quad \text{και} \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— για το δεύτερο χρονικό διάστημα $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) \text{ και}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

— για το νιοστό χρονικό διάστημα $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

$$\text{και } m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Τελικά, η ποσοστιαία εκρόφηση σε κάθε χρονικό διάστημα, $D_{\Delta t_i}$, υπολογίζεται με την ακόλουθη εξίσωση:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

ενώ η ποσοστιαία εκρόφηση D_{t_i} τη χρονική στιγμή t_i δίνεται από την εξίσωση:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

όπου οι ανωτέρω χρησιμοποιούμενες παράμετροι ορίζονται ως:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = μάζα της ουσίας που παραμένει προσροφημένη στο έδαφος μετά τα χρονικά διαστήματα Δt_1, Δt_2,..., Δt_n αντιστοίχως (μg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = μάζα της εκροφουμένης υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια των χρονικών δια στημάτων Δt_1, Δt_2,..., Δt_n αντιστοίχως (μg),

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = μάζα της ουσίας που ανευρίσκεται σε ποσότητα (v_a^D) κατά τις χρονικές στιγμές t_1,t_2,..., t_n, αντιστοίχως (μg),

V_T = συνολικός όγκος της σε επαφή με το έδαφος υδατικής φάσης κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά μέθοδο (cm^3),

m_{aq}^A = μάζα της υπό δοκιμή ουσίας που περισσεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης, (μg),

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = όγκος του υπερκειμένου υγρού που απομακρύνεται από το σωλήνα μετά την απο- κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης και αντικαθίσταται από τον ίδιο όγκο 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3),

v_a^D = όγκος της ποσότητας που δειγματίζεται για αναλυτικούς σκοπούς από το σωλήνα (i), κατά τη διάρκεια του πειράματος κινητικής εκρόφησης που εκτελείται με την εν σειρά μέθοδο, (cm^3),

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

Προσαρτημα 6

ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ-ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΣΕ ΕΛΑΦΗ: ΦΥΛΛΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 °C, 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... °C

Καταλληλότητα της αναλυτικής μεθόδου

Ζυγισθέν έδαφος	g	
Έδαφος: ξηρά μάζα	g	
Όγκος διαλύματος $CaCl_2$	cm^3	
Ονομαστική συγκέντρωση τελικού διαλύματος	$\mu g\ cm^{-3}$	
Συγκέντρωση τελικού διαλύματος βάσει αναλύσεως	$\mu g\ cm^{-3}$	

Αρχή της χρησιμοποιηθείσας αναλυτικής μεθόδου:

Διακρίβωση της αναλυτικής μεθόδου:

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 °C, 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... °C

Ακολουθούμενη αναλυτική μεθοδολογία: Έμμεση ☐ Παράλληλη ☐ Εν σειρά ☐ Αμεση ☐

Δοκιμή προσρόφησης: Δείγματα δοκιμής

	Σύμβολο	Μονάδες	Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας	
Σωλήνας αριθ.										
Ζυγισθέν έδαφος	—	g								
Έδαφος: ξηρά μάζα	m_{soil}	g								
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος (υπολογισθείς)	V_{WS}	cm^3								
Όγκος 0,01 M $CaCl_2$ για εξισορρόπηση του εδάφους		cm^3								
Όγκος αρχικού διαλύματος		cm^3								
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος	V_0	cm^3								
Αρχική συγκέντρωση Διάλυμα δοκιμής	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Μάζα υπό δοκιμή ουσίας στην αρχή της δοκιμής	m_0	μg								

▼B

	Σύμβολο	Μονάδες	Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας		Χρόνος ισορροπίας	
Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρηση										
ΕΜΜΕΣΗ ΜΕΘΟΔΟΣ										
Παράλληλη μέθοδος										
Συγκέντρωση ουσίας στην υδατική φάση, λαμβανομένου υπόψη και του τυφλού	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	μg cm^{-3}								
Εν σειρά μέθοδος										
Μετρηθείσα μάζα ουσίας σε όγκο V_a [A]	$m_m^{ads}(t_i)$	μg								
ΑΜΕΣΗ ΜΕΘΟΔΟΣ										
Μάζα υπό δοκιμή ουσίας προσρο-φημένη στο έδαφος	$m_s^{ads}(t_i)$	μg								
Υπολογισμός προσρόφησης										
Προσρόφηση	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Μέσος ορος										
Συντελεστής προσρόφησης	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Μέσος όρος										
Συντελεστής προσρόφησης	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Μέσος όρος										

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα εδάφους (105 °C, 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... °C

Δοκιμή προσρόφησης: τυφλά και μάρτυρας

	Σύμβολο	Μονάδες	Τυφλό		Τυφλό		Μάρτυρας	
Σωλήνας αριθ.								
Ζυγισθέν έδαφος		g					0	0
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος (υπολογιςθείς)		cm3					—	—
Όγκος προστεθέντος διαλύματος 0,01 M $CaCl_2$		cm^3						
Όγκος του προστεοέντος αρχικού διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας		cm^3	0	0				
Συνολικός όγκος υδατικής φύσεως (υπολογισθείς)		cm3					—	—

▼B

	Σύμβολο	Μονάδες	Τυφλό		Τυφλό		Μάρτυρας	
Αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση		μg cm^{-3}						
Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρηση								
Συγκέντρωση στην υδατική φάση		μg cm^{-3}						

Παρατήρηση: Εφόσον χρειάζεται, προσθέστε στήλες.

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 ºC, 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... ºC

Υπόλοιπο μάζας

	Σύμβολο	Μονάδες				
Σωλήνας αριθ.						
Ζυγισθέν έδαφος	—	g				
Έδαφος: ξηρά μάζα	m_{soil}	g				
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος (υπολογιςθείς)	V_{WS}	ml				
Όγκος 0,01 M $CaCl_2$ για την εξισορρόπηση του εδάφους		ml				
Όγκος αρχικού διαλύματος		cm3				
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος	v_0	cm^3				
Αρχική συγκέντρωση διαλύματος δοκιμής	C_0	μg cm^{-3}				
Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας	—	h				
Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρηση						
Συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση σε ισορροπία προσρόφησης, λαμβανομένου υπόψη και του τυφλού	$C_{aq}^{ads}(eq)$	μg cm^{-3}				
Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας	t_{eq}	η				
1η αραίωση με διαλύτη						
Απομακρυνθείς όγκος υδατικής φάσης	V_{rec}	cm3				
Προστεθείς όγκος διαλύτη	ΔV	cm3				
1η εκχύλιση με διαλύτη						
Αναλυτής σήματος στο διαλύτη	s_{E1}	var.				
Συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη	C_{E1}	Mg cm^{-3}				

▼B

	Σύμβολο	Μονάδες				
Μάζα ουσίας εκχυλισΟείσα από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοχείου	m_{E1}	μg				
2η αραίωση με διαλύτη						
Απομακρυνθείς όγκος διαλύτη	ΔV_S	cm^3				
Προστεθείς όγκος διαλύτη	ΔV	cm^3				
2η εκχύλιση με διαλύτη						
Αναλτής σήματος στη φάση του διαλύτη	S_E	var.				
Συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη	C_{E2}	μg $^{cm-3}$				
Μάζα ουσίας εκχυλισθεισα από το έδαφος και τα τοιχώματα του δοχείου	m_{E2}	μg				
Συολική μάζα υπό δοκιμή ουσίας εκχυλισθεισα σε δύο στάδια	m_E	μg				
Υπόλοιπη μαξα	MB	%				

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα του εδάφους (105 °C. 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... °C

Ισόθερμοι προσρόφησης

	Σύμβολο	Μονάδες								
Σωλήνας αριθ.										
Ζυγισθέν έδαφος	—	g								
Έδαφος: ξηρά μάζα	E	g								
Όγκος ύδατος στο ζυγισθέν έδαφος {υπολογισθείς)	v_{ws}	cm^3								
Όγκος 0,01 M $CaCl_2$ για εξισορρόπηση του εδάφους		cm^3								
Όγκος προστεθέντος αρχικού διαλύματος		cm^3								
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος (υπολογισθείς)	V_0	cm^3								
Συγκέντρωση διαλύματος	C_0	μg cm^{-3}								
Χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας	—	h								

▼B

	Σύμβολο	Μονάδες								
Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρηση										
Συγκέντρωση ουσίας στην υδατική φάση, λαμβανομένου υπόψη και του τυφλού	$C_{aq}^{ads}(eq)$	μg cm^{-3}								
Θερμοκρασία		X								
Προσροφη9είσα μάζα ανά μονάδα εδάφους	$C_{s}^{ads}(eq)$	μg g^{-1}								

Αναγωγή:

τιμή $K^{ads}{}_{t}$:

τιμή l/n:

συντελεστής αναγωγής r^2:

Υπό δοκιμή ουσία:

Υπό δοκιμή έδαφος:

Ξηρά μάζα εδάφους (105 °C, 12 h): ..... %

Θερμοκρασία: ..... °C

Ακολουθηθείσα μεθοδολογία ανάλυσης: Έμμεση □ Παράλληλη □ Εν σειρά □

Δοκιμή εκρόφησης

		Σύμβολο	Μονάδες	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα
Σωλήνας αριθ. προερχόμενος από το στάδιο προσρόφησης							
Μάζα ουσίας προσροφη9είσα στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας προσρόφησης		$m_{s}^{ads}(eq)$	μg				
Απομακρυνθείς όγκος υδατικής φάσης, αντικατασταθείς από 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Συνολικός όγκος υδατικής φάσης σε επαφή με το έδαφος	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm				
Μάζα ουσίας που περισσεύει από την ισορροπία προσρόφησης λόγω ατελούς κατ' όγκο αντικατάστασης		m_{aq}^{A}	μg				

Κινητική εκρόφησης

Μετρηθείσα μάζα εκροφημένης από το έδαφος ουσίας τη χρονική στιγμή t_1		$m_{m}^{des}(t_i)$	μg				
Όγκος του διαλύματος που λαμβάνεται από το σωλήνα (i) για τη μέτρηση της υπό δοκιμή ουσίας	PM	V_{t}^{i}	cm^3				
	SM	$V^{D}{}_{a}$	cm^3				
Μάζα ουσίας εκροφημένη από το έδαφος τη χρονική στιγμή t_i (υπολογισθείσα)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	μg				
Μάζα ουσίας εκροφουμένη από το έδαφος κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος Δt_i (υπολογισθείσα)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	μg				

▼B

	Σύμβολο	Μονάδες	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα	Χρονικό διάστημα
Ποσοστιαία εκρόφηση						
Εκρόφηση τη χρονική στιγμή t_i	D_{ti}	%				
Εκρόφηση κατά το χρονικό διάστημα At_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Φαινομενικός συντελεστής εκρόφησης	K_{des}					

PM: Παράλληλη μέθοδος

SM: Εν σειρά μέθοδος

▼B

Γ.19. **ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ (K_{OC}) ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΑΣΠΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΝΟΜΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αναπαραγωγή της OECD TG121 (2000).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ροφητική συμπεριφορά των ουσιών στο έδαφος ή στις λάσπες των υπονόμων μπορεί να περιγραφεί μέσω παραμέτρων που προσδιορίζονται πειραματικά με τη μέθοδο δοκιμής Γ.18. Μια σημαντική παράμετρος είναι ο συντελεστής προσροφήσεως που ορίζεται ως ο λόγος της συγκεντρώσεως της ουσίας στο έδαφος/λάσπη προς τη συγκέντρωση της ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας προσροφήσεως. Ο τυποποιημένος σε σχέση με την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα του εδάφους συντελεστής προσροφήσεως K_{oc} είναι ένας χρήσιμος δείκτης της συνδετικής ικανότητας μιας χημικής ουσίας με την οργανική ύλη του εδάφους και τη λάσπη των υπονόμων που επιτρέπει να γίνονται συγκρίσεις μεταξύ διαφόρων χημικών ουσιών. Η παράμετρος αυτή μπορεί να υπολογιστεί μέσω συσχετισμού με την υδατοδιαλυτότητα και το συντελεστή κατανομής ν-οκτανόλης/νερού (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Στην πειραματική μέθοδο που περιγράφεται στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται HPLC για τον υπολογισμό του συντελεστή προσρόφησης K_{oc} στο έδαφος και στη λάσπη των υπονόμων (8). Τα αποτελέσματα είναι μεγαλύτερης αξιοπιστίας από εκείνα που λαμβάνονται με υπολογισμούς QSAR (9). Ως εκτιμητική μέθοδος, δεν μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως τα πειράματα ισορροπίας παρτίδας που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο δοκιμής Γ.18. Εντούτοις, η υπολογιζόμενη K_{oc} μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη για την επιλογή κατάλληλων παραμέτρων δοκιμής για μελέτες προσρόφησης/εκρόφησης σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμής Γ.18 με υπολογισμό του K_d (συντελεστής κατανομής) ή K_f (συντελεστής προσρόφησης Freundlich) σύμφωνα με την εξίσωση 3 (βλέπε σημείο 1.2).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

K_d: Ως συντελεστής κατανομής ορίζεται ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας C διαλελυμένης υπό δοκιμή ουσίας σε διφασικό σύστημα που αποτελείται από ένα ροφητικό μέσο (έδαφος ή λάσπη υπονόμων) και μια υδατική φάση. Είναι αδιάστατο μέγεθος όταν οι συγκεντρώσεις και στις δύο φάσεις εκφράζονται ως βάρος/βάρος. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση στην υδατική φάση δίνεται ως βάρος/όγκο, τότε οι μονάδες είναι ml· g^{-1}. Ο K_d μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τις ιδιότητες του ροφητικού μέσου, ενώ μπορεί να εξαρτάται και από τη συγκέντρωση.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} or \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

όπου:

C_{soil} = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος σε κατάσταση ισορροπίας (μg· g^{-1}),

C_{sludge} = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας σιη λάσπη σε κατάσταση ισορροπίας (μg· g^{-1}),

C_{aq} = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας (μg· g^{-1}, μg . ml^{-1}).

▼B

K_f: Ως συντελεστής προσρόφησης Freundlich ορίζεται η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος ή στη λάσπη υπονόμων (x/m) όταν η συγκέντρωση σε κατάσταση ισορροπίας C_{aq} στην υδατική φάση είναι ίση με ένα. Οι μονάδες είναι μg· g^{-1} ροφητικού μέσου. Η τιμή μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τις ιδιότητες του ροφητικού μέσου.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log C_{aq} \quad (2)$$

όπου:

x/m = ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας χ (μg) προσφροφημένη σε ποσότητα ροφητικού m (g) σε κατάσταση ισορροπίας,

1/η = κλίση της ισοθέρμου προσρόφησης Freundlich,

C_{aq} = συγκέντρωση της υπο δοκιμή ουσίας στην υδατική φάση σε κατάσταση ισορροπίας (μg· ml^{-1}).

$$\Sigma\varepsilon\ C_{aq} = 1; \log K_f = \log\frac{x}{m}$$

K_{oc}: Συντελεστής κατανομής (K_d) ή συντελεστής κατανομής Freundlich (K_f) τυποποιημένος ως προς την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (f_{oc}) ενός ροφητικού. Στην περίπτωση, ιδιαίτερα, μη ιοντισμένων χημικών ουσιών, αποτελεί κατά προσέγγιση δείκτη του βαθμού προσρόφησης μεταξύ μιας ουσίας και του ροφητικού και παρέχει τη δυνατότητα πραγματοποίησης συγκρίσεων μεταξύ διαφόρων χημικών ουσιών. Ανάλογα με τις διαστάσεις των K_d και K_f ο K_{oc} μπορεί να είναι αδιάστατος ή να έχει τις μονάδες ml· g^{-1} ή μg· g^{-1} οργανικής ύλης.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}(\text{αδιάστατος ή } ml\cdot g^{-1}) or \frac{Kf}{foc}(\mu g\cdot g^{-1}) \quad (3)$$

Η σχέση μεταξύ K_{oc} και K_d δεν είναι πάντοτε γραμμική και έτσι, οι τιμές του K_{oc}, μπορεί να ποικίλουν από έδαφος σε έδαφος, η μεταβλητότητα τους όμως είναι μειωμένη σε μεγάλο βαθμό σε σύγκριση με τις τιμές των K_d ή K_f.

Ο συντελεστής προσροφήσεως (K_{oc}) εξάγεται από τον παράγοντα ικανότητας (k') χρησιμοποιώντας καμπύλη διακρίβωσης του log k' συναρτήσει του log K_{oc} των επιλεγμένων ενώσεων αναφοράς.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

όπου:

t_R: χρόνος κατακράτησης υπό δοκιμή ουσίας και ουσίας αναφοράς HPLC (λεπτά),

t_0: νεκρός χρόνος HPLC (λεπτά) (βλέπε σημείο 1.S.2).

P_{0W}: Ως συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού ορίζεται ο λόγος των συγκεντρώσεων της διαλελυμένης ουσίας σε n-οκτανόλη και νερό. Είναι αδιάστατο μέγεθος.

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq}(Kow) \quad (5)$$

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Πριν να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος, θα πρέπει να είναι γνωστά ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα και η σταθερά διαστάσεως (εάν υπάρχει). Χρήσιμο, επίσης, είναι να υπάρχουν στοιχεία για τη διαλυτότητα στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, για το συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού και για τα χαρακτηριστικά υδρόλυσης.

▼B

Για να συσχετισιούν τα μετρούμενα δεδομένα κατακράτησης HPLC μιας υπό δοκιμή ουσίας με το συντελεσή προσροφήσεως K_{oc}, πρέπει να χαραχθεί καμπύλη διακρίβωσης του log K_{oc} συναρτήσει του log k^T. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται έξι, κατ' ελάχιστο, σημεία αναφοράς, τουλάχιστον ένα πάνω και ένα κάτω από την αναμενόμενη τιμή της υπό δοκιμή ουσίας. Η ορθότητα (accuracy) της μεθόδου βελτιώνεται σημαντικά αν χρησιμοποιηθούν ουσίες αναφοράς με σύνταξη σχετική με εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας. Εφόσον δεν υπάρχουν διαθέσιμα τέτοια δεδομένα, επαφίεται στον χρήστη να επιλέξει τις κατάλληλες ουσίες διακρίβωσης. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να επιλέγεται ένα γενικότερο σύνολο συντακτικώς ετερογενών ουσιών. Ουσίες και τιμές K_{oc} που μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναγράφονται στο προσάρτημα, στον πίνακα 1 για τη λάσπη υπονόμων και στον πίνακα 3 για το έδαφος. Τυχόν επιλογή άλλων ουσιών διακρίβωσης θα πρέπει να αιτιολογείται.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η HPLC εκτελείται σε αναλυτικές στήλες πληρωμένες με διαθέσιμη στο εμπόριο κυανοπροπυλική στερεά φάση, η οποία περιέχει λιπόφιλα και πολικά τμήματα. Χρησιμοποιείται μετρίως πολική στατική φάση με βάση πυρίτια:

- O - Si	- CH_2 - CH_2 - CH_2	- CN
πυριτία	μη πολικό τμήυα διαχωρισυού	πολικό τμήμα

Η αρχή της μεθόδου είναι παρόμοια με εκείνη της μεθόδου δοκιμής A.8 (συντελεστής κατανομής, μέθοδος HPLC). Η ουσία, καθώς διέρχεται διαμέσου της στήλης μαζί με την κινητή φάση, αλληλεπιδρά με τη στατική φάση. Λόγω της κατανομής μεταξύ κινητής και στατικής φάσης, η υπό δοκιμή ουσία καθυστερεί. Η διττή σύσταση της στατικής φάσης με πολικές και μη πολικές περιοχές επιτρέπει την αλληλεπίδραση πολικών και μη πολικών ομάδων ενός μορίου με παρόμοιο τρόπο όπως στην περίπτωση οργανικής ύλης ευρισκόμενης στο έδαφος ή σε λάσπη υπονόμων. Αυτό δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της σχέσης μεταξύ χρόνου κατακράτησης στη στήλη και συντελεστή προσρόφησης στην οργανική ύλη.

Το pH έχει σημαντική επίδραση στη ροφητική συμπεριφορά, ιδιαίτερα στην περίπτωση πολικών ουσιών. Στα γεωργικά εδάφη ή στις δεξαμενές εργοστασίων επεξεργασίας λυμάτων, το pH κυμαίνεται, κανονικά, μεταξύ pH 5,5 και 7,5. Για τις ιοντίσιμες ουσίες, θα πρέπει να πραγματοποιούνται δύο δοκιμές, σε ιοντισμένη και σε μη ιοντισμένη μορφή, σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα, στις περιπτώσεις όμως μόνο όπου το 10 % τουλάχιστον της υπό δοκιμή ενώσεως διίσταται σε περιοχή pH 5,5 έως 7,5.

Δεδομένου ότι, για την εκτίμηση, χρησιμοποιείται μόνον η σχέση μεταξύ της κατακράτησης στη στήλη HPLC και του συντελεστή προσρόφησης, δεν απαιτείται κάποια ποσοτική αναλυτική μέθοδος και αυτό που χρειάζεται μόνον είναι ο προσδιορισμός του χρόνου κατακράτησης. Εάν υπάρχει διαθέσιμο κάποιο κατάλληλο σύνολο ουσιών αναφοράς και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τυπικές πειραματικές συνθήκες, η μέθοδος παρέχει έναν ταχύ και αποτελεσματικό τρόπο εκτίμησης του συντελεστή προσρόφησης K_{oc}.

1.5. ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η μέθοδος HPLC μπορεί να εφαρμοστεί σε χημικές ουσίες (επισημασμένες ή μη) για τις οποίες υπάρχει διαθέσιμο κάποιο κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης (π.χ. φασματοφωτόμετρο, ανιχνευτής ραδιενέργειας) και οι οποίες είναι επαρκώς σταθερές κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ιδιαίτερα χρήσιμη μπορεί να αποδειχθεί για ουσίες που είναι δύσκολο να μελετηθούν σε άλλα πειραματικά συστήματα (δηλαδή πτητικές ουσίες, ουσίες οι οποίες δεν είναι διαλυτές στο νερό σε επίπεδα συγκέντρωσης που να μπορούν να μετρηθούν αναλυτικά, ουσίες υψηλής συγγένειας με την επιφάνεια συστημάτων επώασης). Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μείγματα που παρέχουν μη διακριτές ζώνες εκλούσεως. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να δηλώνονται τα άνω και κάτω όρια των τιμών log K_{oc} των ενώσεων του υπό δοκιμή μείγματος.

▼B

Η ύπαρξη προσμείξεων μπορεί, μερικές φορές, να προκαλέσει προβλήματα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων HPLC, δεν έχει όμως ιδιαίτερη σημασία εφόσον η υπό δοκιμή ουσία μπορεί σαφώς να ταυτοποιηθεί αναλυτικά και να διαχωριστεί από τις προσμείξεις.

Η μέθοδος είναι έγκυρη για τις ουσίες που περιλαμβάνονται στον πίνακα 1 του προσαρτήματος, ενώ εφαρμόζεται επίσης και σε διάφορες άλλες χημικές ουσίες που ανήκουν στις ακόλουθες χημικές τάξεις:

— αρωματικές αμίνες (π.χ. τριφλουραλίνη, 4-χλωροανιλίνη, 3,5-δινιτροανιλίνη, 4-μεθυλανιλίνη, N-μεθυλανιλίνη, 1-ναφθυλαμίνη),

— εστέρες αρωματικών καρβοξυλικών οξέων (π.χ. μεθυλεστέρας βενζοϊκού οξέος, αιθυλεστέρας 3,5-δινιτροβενζο-ϊκού οξέος),

— αρωματικοί υδρογονάνθρακες (π.χ. τολουόλιο, ξυλόλιο, αιθυλοβενζόλιο, νιτροβενζόλιο),

— εστέρες αρυλοξυφαινοξυπροπιονικών οξέων (π.χ. diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl),

— μυκητοκτόνα βενζιμιδαζολίου και ιμιδαζολίου (π.χ. carbendazim, fuberidazole, triazoxide),

— αμίδια καρβοξυλικών οξέων (π.χ. 2-χλωροβενζαμίδιο, N.N-διμεθυλοβενζαμίδιο, 3,5-δινιτροβενζαμίδιο, N-μεθυλο-βενζαμίδιο, 2-νιτροβενζαμίδιο, 3-νιτροβενζαμίδιο),

— χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (π.χ. endosulfan. DDT, εξαχλωροβενζόλιο, quintozene, 1,2,3-τριχλωροβενζόλιο),

— οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (π.χ. azinphos-methyl, disulfoton, fenamiphos, isofenphos, pyrazophos, sulprofos, triazophos),

— φαινόλες (π.χ. φαινόλη, 2-νιτροφαινόλη, 4-νιτροφαινόλη. πενταχλωροφαινόλη, 2,4,6-τριχλωροφαινόλη. 1-να-φθόλη),

— παράγωγα φαινυλουρίας (π.χ. isoproturon, monolinuron. pencycuron),

— χρωστικές πιγμέντων (π.χ. Acid Yellow 219. Basic Blue 41, Direct Red 81),

— πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (π.χ. ακεναφθένιο, ναφθαλίνιο),

— ζιζανιοκτόνα 1,3,5-τριαζίνης (π.χ. προμετρζν, προπαυινε. σιμαυινε, τερβθτρζν),

— παράγωγα τριαζολίου (π.χ. tebuconazole, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Η μέθοδος δεν εφαρμόζεται σε ουσίες του αντιδρούν είτε με το εκλουστικό μέσο, είτε με τη στατική φάση. Δεν εφαρμόζεται επίσης σε ουσίες που αλληλεπιδρούν με ειδικό τρόπο με ανόργανα συστατικά (π.χ. σχηματισμός συμπλόκων με ορυκτές αργίλους). Η μέθοδος μπορεί να μην είναι κατάλληλη για επιφανειοδραστικές ουσίες, ανόργανες ενώσεις και μετρίως ή ισχυρά οργανικά οξέα και βάσεις. Μπορούν να προσδιοριστούν τιμές log K_{oc} στην περιοχή από 1,5 έως 5,0. Οι ιοντίσιμες ουσίες πρέπει να μετρώνται με τη χρησιμοποίηση ρυθμισμένης κινητής φάσης, πρέπει όμως να δίνεται προσοχή για την αποφυγή καθίζησης ρυθμιστικών συστατικών ή της υπό δοκιμή ουσίας.

▼B

1.6. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

1.6.1. **Ορθότητα**

Κανονικά, ο συντελεστής προσρόφησης μιας υπό δοκιμή ουσίας μπορεί να εκτιμηθεί με προσέγγιση ± 0,5 λογαριθμικής μονάδας της τιμής που προσδιορίζεται με τη μέθοδο ισορροπίας παρτίδας (βλέπε πίνακα 1 στο προσάρτημα). Υψηλότερη ορθότητα μπορεί να επιτευχθεί, εφόσον οι χρησιμοποιούμενες ουσίες αναφοράς έχουν συντακτική δομή σχετική με εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας.

1.6.2. **Επαναληψιμότητα**

Οι προσδιορισμοί θα πρέπει να γίνονται τουλάχιστον εις διπλούν. Οι τιμές log K_{oc} που προέρχονται από μεμονωμένες μετρήσεις θα πρέπει να κυμαίνονται στα πλαίσια 0,25 λογαριθμικής μονάδας.

1.6.3. **Αναπαραγωγιμότητα**

Η εμπειρία που έχουν αποκομιστεί μέχρι τώρα από την εφαρμογή της μεθόδου αποτελεί στοιχείο υποστηρικτικό της εγκυρότητάς της. Διερεύνηση της μεθόδου HPLC, χρησιμοποιώντας 48 ουσίες (κατά το πλείστον γεωργικά φάρμακα) για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμα αξιόπιστα δεδομένα για το K_{oc} σε εδάφη, έδωσε συντελεστή συσχετισμού R = 0,95 (10) (11).

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή συγκριτική δοκιμή με 11 συμμετέχοντα εργαστήρια για τη βελτίωση και επικύρωση της μεθόδου (12). Τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 2 του προσαρτήματος.

1.7. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.7.1. **Προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή προσρόφησης**

Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού P_{0W}. (= K_{oc}) και, σε έναν ορισμένο βαθμό, η υδατοδιαλυτότητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες του βαθμού προσρόφησης, ιδιαίτερα για μη ιοντίσιμες ουσίες και, έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για προκαταρκτική εύρεση εύρους. Έχουν δημοσιευτεί ποικίλοι χρήσιμοι συσχετισμοί για διάφορες ομάδες χημικών ουσιών (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Εξοπλισμός**

Απαιτείται υγρός χρωματογράφος, εφοδιασμένος με απαλμική α\τλία και κατάλληλη διάταξη ανίχνευσης. Συνιστάται η χρήση βαλβίδας εγχύσεως με βρόχο εγχύσεως. Πρέπει να χρησιμοποιούνται διαθέσιμες στο εμπόριο κυανοπροπυ-λικές ρητίνες ενωμένες χημικώς σε βάση πυριτίας (π.χ. Hypersil και Zorbax CN). Μεταξύ του συστήματος εγχύσεως και της αναλυτικής στήλης μπορεί να τοποθετηθεί στήλη προφύλαξης. Οι στήλες από διάφορους προμηθευτές μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από πλευράς ικανότητας διαχωρισμού. Κατά κανόνα, θα πρέπει να επιτυγχάνονται οι ακόλουθοι παράγοντες ικανότητας k': log k' > 0,0 για log K_{oc} = 3,0 και log k' > - 0,4 για log K_{oc} = 2,0 όταν, ως κινητή φάση, χρησιμοποιείται μεθανόλη/νερό 55/45 %.

1.7.3. **Κινητές φάσεις**

Έχουν δοκιμαστεί διάφορες κινητές φάσεις και από αυτές συνιστώνται οι ακόλουθες δύο:

— αεθανολη/νερό (55/45 % V/V).

— μεθανόλη/ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,01 M, pH 6,0 (55:45 % v/v).

▼B

Για την παρασκευή του διαλύτη εκλούσεως χρησιμοποιούνται μεθανόλη καθαρότητας HPLC και απεσταγμένο νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών. Το μείγμα απαεριώνεται πριν από τη χρήση. Θα πρέπει να γίνεται χρήση ισοκρατικής εκλούσεως. Εάν τα μείγματα μεθανόλης/νερού δεν είναι κατάλληλα, μπορούν να δοκιμαστούν και μείγματα άλλου οργανικού διαλύτη/νερού, π.χ. μίγματα αιθανόλης/νερού ή ακετονιτριλίου/νερού. Για τις ιοντίσιμες ενώσεις, συνιστάται η χρησιμοποίηση ρυθμιστικού διαλύματος για τη σταθεροποίηση του pH. Πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην αποφυγή καθίζησης αλάτων και φθοράς της στήλης, πράγμα το οποίο μπορεί να συμβεί με ορισμένα μείγματα οργανικής φάσης/ρυθμιστικού.

Πρόσθετα, όπως αντιδραστήρια ιοντικού ζεύγους, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν επειδή μπορεί να επηρεάσουν τις ροφητικές ιδιότητες της στατικής φάσης. Οι αλλαγές αυτές της στατικής φάσης μπορεί να είναι μη αναστρέψιμες. Για το λόγο αυτό, πειράματα στα οποία χρησιμοποιούνται πρόσθετα, είναι υποχρεωτικό να γίνονται σε ξεχωριστές στήλες.

1.7.4. **Διαλυόμενα σώματα**

Οι ουσίες δοκιμής και αναφοράς θα πρέπει να διαλύονται στην κινητή φάση.

1.8. ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.8.1. **Συνθήκες δοκιμής**

Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια των μετρήσεων θα πρέπει να καταγράφεται. Συνιστάται ζωηρά η χρησιμοποίηση διαμερίσματος στήλης ελεγχόμενης θερμοκρασίας για τη διασφάλιση σταθερών συνθηκών κατά τη διάρκεια των εργασιών διακρίβωσης και εκτίμησης και μέτρησης της υπό δοκιμή ουσίας.

1.8.2. **Προσδιορισμός του νεκρού χρόνου t_0**

Για τον προσδιορισμό του νεκρού χρόνου t_0, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο διαφορετικές μέθοδοι (βλέπε επίσης σημείο 1.2).

1.8.2.1. *Προσδιορισμός του νεκρού χρόνου t_0 μέσω ομόλογης σειράς*

Η διαδικασία αυτή έχει αποδειχθεί ότι παρέχει αξιόπιστες και τυποποιημένες τιμές t_0. Για λεπτομέρειες, βλέπε μέθοδο δοκιμής A.8: συντελεστής κατανομής (ηοκτανόλη/νερό), μέθοδος HPLC.

1.8.2.2. *Προσδιορισμός του νεκρού χρόνου t_0 με αδρανείς ουσίες που δεν κατακρατούνται από τη στήλη*

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην έγχυση διαλυμάτων φορμαμιδίου, ουρίας ή νιτρικού νατρίου. Οι μετρήσεις θα πρέπει να γίνονται τουλάχιστον εις διπλούν.

1.8.3. **Προσδιορισμός των χρόνων κατακράτησης t_R**

Οι ουσίες αναφοράς θα πρέπει να επιλέγονται όπως περιγράφεται στο σημείο 1.3. Μπορούν να εγχύονται ως μικτό πρότυπο για τον προσδιορισμό των χρόνων κατακράτησής τους, υπό την προϋπόθεση ότι έχει επιβεβαιωθεί ότι ο χρόνος κατακράτησης κάθε κάθε προτύπου αναφοράς δην επηρεάζεται από την παρουσία των άλλων προτύπων αναφοράς. Η διακρίβωση θα πρέπει να εκτελείται σε τακτικά χρονικά διαστήματα δύο φορές, τουλάχιστον, ημερησίως, ώστε να λαμβάνονται υπόψη τυχόν απροσδόκητες μεταβολές στην απόδοση της στήλης. Το καλύτερο είναι, οι εγχύσεις διακρίβωσης να πραγματοποιούνται πριν και μετά τις εγχύσεις της υπό δοκιμή ουσίας ώστε να επιβεβαιώνεται ότι δεν έχουν υπάρξει μεταβολές στους χρόνους κατακράτησης. Οι υπό δοκιμή ουσίες εγχύονται ξεχωριστά σε όσο το δυνατό μικρότερες ποσότητες (για να αποφεύγεται υπερφόρτωση της στήλης) και προσδιορίζονται οι χρόνοι κατακράτησης τους.

▼B

Για την αύξηση της αξιοπιστίας της μετρήσεως, θα πρέπει να γίνονται δύο, τουλάχιστον, προσδιορισμοί. Οι τιμές του log K_{0C} που προέρχονται από μεμονωμένες μετρήσεις θα πρέπει να είναι σια όρια του 0,25 λογαριθμικής μονάδας.

1.8.4. **Εκτίμηση**

Οι παράγοντες ικανότητας k' υπολογίζονται από το νεκρό χρόνο t_0 και τους χρόνους κατακράτησης t_R των επιλεγμένων ουσιών αναφοράς σύμφωνα με την εξίσωση 4 (βλέπε σημείο 1.2). Στη συνέχεια, τα δεδομένα του log k' των ουσιών αναφοράς σημειώνονται επί χάρτου συναρτήσει των τιμών του log K_{oc} από δοκιμές ισορροπίας παρτίδας που εμφαίνονται στους πίνακες 1 και 3 του προσαρτήματος. Χρησιμοποιώντας τη γραφική αυτή συνάρτηση, η τιμή log k' μιας υπό δοκιμή ουσίας χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της τιμής της log K_{OC} Εάν τα λαμβανόμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο K_{oc} της υπό δοκιμή ουσίας είναι εκτός της περιοχής διακρίβωσης, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται χρησιμοποιώντας διαφορετικές, πιο κατάλληλες ουσίες αναφοράς.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ**

Στην έκθεση πρέπει να αναφέρονται τα ακόλουθα στοιχεία:

— ταυτότητα των ουσιών δοκιμής και αναφοράς και καθαρότητα τους, καθώς και οι τιμές pK_a, αν χρειάζεται,

— περιγραφή εξοπλισμού και συνθηκών εργασίας, π.χ. τύπος και διαστάσεις της αναλυτικής (και προφυλακτικής) στήλης, μέσα ανίχνευσης, κινητή φάση {λόγος συστατικών και pH), περιοχή θερμοκρασιών κατά τις μετρήσεις,

— νεκρός χρόνος και μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της,

— ποσότητες ουσιών δοκιμής και αναφοράς που εισάγονται στη στήλη,

— χρόνοι κατακράτησης των ουσιών αναφοράς που χρησιμοποιούνται για διακρίβωση,

— λεπτομέρειες για τη διαμορφωμένη καμπύλη αναγωγής (log k' συναρτήσει log K_{oc}) και γράφημα της καμπύλης αναγωγής,

— στοιχεία μέσου χρόνου κατακράτησης και εκτιμώμενη τιμή log K_{oc} για την υπό δοκιμή ουσία,

— χρωματογραφήματα.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, DAY. Schmedding (198 3). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kordel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35-(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) \V. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff,). Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

Προσαρτημα

Πίνακας 1

Σύγκριση τιμών K_{OC} για εδάφη και λάσπες υπονόμων και εκτιμώμενες τιμές με τη μέθοδο προσανατολισμού HPLC ([1]) ([2])

Ουσία	Αριθ. CAS	log K_{OC} λασπών υπονόμων	log K_{OC} HPLC	Δ	log K_{OC} εδαφών	log K_{OC} HPLC	Δ
Ατραζίνη	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Φαινανθρένιο	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Φαινυλεστέρας βενζοϊκού οξέος	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Βενζαμίδιο	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Νιτροβενζαμίδιο	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Ακετανιλίδιο	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Ανιλίνη	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Διχλωροανιλίνη	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), pp. 107-119.

Πίνακας 2

Αποτελέσματα διεργαοτηριακής συγκριτικής δοκιμής (11 συμμετέχοντα εργαστήρια) που πραγματοποιήθηκε για τη βελτίωση και επικύρωση της μεθόδου HPLC ([1])

Ουσία	Αριθ. CAS	log K_{oc}	K_{OC}	log $K_{(K}$
		(OECD 106)	(Μέθοδος HPLC)	
Ατραζίνη	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 + 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff,]. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30([7]). pp. 1373-1384.

▼B

Πίνακας 3

Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς για τη μέθοδο προσανατολισμού HPLC που βασίζεται σε δεδομένα προσρόφησης εδάφους

Ουσία αναφοράς	Αριθ. CAS	Μέσες τιμές log K_{OC} από ισορροπία παρτίδας	Αριθμός δεδομένων K_{oc}	log S.D.	Πηγή
Ακετανιλίδιο	103-84-4	1,25	4	0,48	(α)
Φαινόλη	108-95-2	1,32	4	0,70	(α)
2-Νιτροβενζαμίδιο	610-15-1	1,45	3	0,90	(β)
N, N-διμεθυλοβενζαμίδιο	611-74-5	1,52	2	0,45	(α)
4-Μεθυλοβενζαμίδιο	619-55-6	1,78	3	1,76	(α)
Βενζοικός μεθυλεστέρας	93-58-3	1,80	4	1,08	(α)
Ατραζίνη	1912-24-9	1,81	3	1,08	(γ)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(γ)
3-Νιτροβενζαμίδιο	645-09-0	1,95	3	1,31	(β)
Ανιλίνη	62-53-3	2,07	4	1,73	(α)
3,5-Δινιτροβενζαμίδιο	121-81-3	2,31	3	1,27	(β)
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(γ)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(γ)
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	(γ)
Triazophos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(γ)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(γ)
Ναφθαλίνιο	91-20-3	2,75	4	2,20	(α)
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(γ)
Methiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(γ)
Acid Yellow 219	63405-8 5-6	3,16	4	2,83	(α)
1,2,3-Τριγλωροβενζόλιο	87-61-6	3,16	4	1,40	(α)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(α)
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	(γ)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(α)
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(γ)
a-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(γ)
Diclofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	(γ)
Φαινανθρένιο	85-01-8	4,09	4	3,83	(α)
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(α)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(β)

(α) W. Kördel, J. Müller (1994), Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R&D Report No 106 01044 (1904).
(β) B.V. Oepen. \V. Kördel. \V. Klein (1991)i. Chemosphere, 22, pp. 2S5-304,
(γ) Data provided by industry.

▼B

Γ.20. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ DAPHNIA MAGNA

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η εν λόγω μέθοδος μελέτης τοξικότητας κατά την αναπαραγωγή αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 211 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρωταρχικός στόχος της δοκιμασίας είναι να μελετηθούν οι επιπτώσεις των χημικών ουσιών στην αναπαραγωγή των *Daphnia magna*.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

Γεννήτορες: πρόκειται για τα θηλυκά *Daphnia* που είναι παρόντα κατά την έναρξη της δοκιμασίας και των οποίων οι αναπαραγωγικές επιδόσεις αποτελούν αντικείμενο της παρούσας μελέτης.

Απόγονοι: είναι τα νεαρά *Daphnia* που παράγονται από τους γεννήτορες στη διάρκεια της δοκιμασίας.

Ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίπτωσης (LOEC): είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ότι μια ουσία έχει επίπτωση στατιστικώς σημαντική (με $\rho < 0,05$) σε συγκεκριμένη χρονική διάρκεια έκθεσης, στη θνησιμότητα των γεννητόρων και στην αναπαραγωγή, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Εντούτοις, όλες οι συγκεντρώσεις οι μεγαλύτερες από τη LOEC πρέπει να ασκούν βλαβερή επίδραση ισοδύναμη ή μεγαλύτερη από την παρατηρούμενη με τη LOEC. Όταν δεν ικανοποιούνται οι δύο αυτές προϋποθέσεις, πρέπει να εξηγείται αναλυτικά πώς επελέγη η τιμή της LOEC (και κατά συνέπεια της NOEC).

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίπτωσης (NOEC): είναι η συγκέντρωση η αμέσως χαμηλότερη της LOEC, η οποία, συγκριτικά με τους μάρτυρες, δεν έχει επίπτωση στατιστικώς σημαντική (με $\rho < 0,05$) σε συγκεκριμένη χρονική διάρκεια έκθεσης.

EC_x: είναι η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας διαλελυμένης σε νερό, που έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται κατά χ % η αναπαραγωγή των *Daphnia magna* μέσα σε συγκεκριμένη χρονική διάρκεια έκθεσης.

Πραγματικός ρυθμός αύξησης: είναι ένα μέτρο της αύξησης του πληθυσμού στο οποίο συνυπάρχουν οι αναπαραγωγικές επιδόσεις και η θνησιμότητα ηλικίας (20) (21) (22). Σε σταθερούς πληθυσμούς είναι μηδενικός, σε αυξανόμενους είναι θετικός, αρνητικός δε σε πληθυσμούς που συρρικνώνονται. Στην τελευταία περίπτωση, οι πληθυσμοί προφανώς δεν είναι βιώσιμοι και τελικώς θα εξαφανιστούν.

Όριο ανίχνευσης: είναι η χαμηλότερη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση, όχι όμως και ποσοτικώς μετρήσιμη.

Όριο προσδιορισμού: είναι η χαμηλότερη ποσοτικώς μετρήσιμη συγκέντρωση.

Θνησιμότητα: ζώο καταγράφεται ως νεκρό εφόσον παραμένει ακίνητο, που σημαίνει όταν δεν μπορεί να κολυμπήσει ή όταν δεν παρατηρηθεί κίνηση των αποφύσεων ή της οπίσθιας κοιλιακής χώρας μέσα σε 15 δευτερόλεπτα μετά από ελαφρά ανατάραξη του δοχείου της δοκιμής. (Εάν χρησιμοποιηθεί άλλος ορισμός, αναφέρεται υποχρεωτικά, μαζί με κάθε σχετική παραπομπή).

▼B

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Νεαρά θηλυκά *Daphnia* (οι γεννήτορες), ηλικίας μικρότερης των 24 ωρών κατά την έναρξη της δοκιμασίας, εκτίθενται σε μια σειρά υδατικών διαλυμάτων της δοκιμαζόμενης ουσίας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η διάρκεια της δοκιμασίας είναι 21 ημέρες. Με την ολοκλήρωση της δοκιμασίας, υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός ζώντων απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα. Αυτό σημαίνει ότι αποκλείονται από τους υπολογισμούς απόγονοι (juveniles) γεννητόρων που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας. Οι αναπαραγωγικές επιδόσεις των γεννητόρων υπάρχει τρόπος να εκφραστούν και αλλιώς (π.χ. αριθμός ζώντων απογόνων (offspring) ανά γεννήτορα σε ημερήσια βάση, αρχής γενομένης από την πρώτη ημέρα κατά την οποία εμφανίζονται απόγονοι), τα δεδομένα όμως αυτά πρέπει να αναφέρονται επιπλέον του συνολικού αριθμού ζώντων απογόνων (juveniles) ανά ζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας. Οι αναπαραγωγικές επιδόσεις των ζώων που εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία συγκρίνονται προς το αντίστοιχο των μαρτύρων, νια να προσδιοριστεί η τιμή LOEC και συνεπώς η NOEC. Επιπλέον, και στο βαθμό που είναι δυνατό, τα δεδομένα αναλύονται με βάση ένα αναγωγικό μοντέλο για να υπολογιστεί κατ' εκτίμηση η συγκέντρωση που προκαλεί x % μείωση του αναπαραγωγικού αποτελέσματος (π.χ. EC_{50} EC_{20}, ή EC_{10}).

Αναφέρονται επίσης η επιβίωση των γεννητόρων και ο χρόνος μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρώτοι απόγονοι. Μπορεί να εξεταστούν και άλλες επιπτώσεις (που σχετίζονται με την ουσία) σε παραμέτρους όπως η ανάπτυξη (π.χ. μήκος), ενδεχομένως δε και ο πραγματικός ουθμός αύξησης.

1.4. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΖΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Πρέπει να είναι γνωστά τα αποτελέσματα μιας δοκιμασίας μελέτης οξείας τοξικότητας (βλέπε μέθοδο Γ.2 μέρος Ι) που πραγματοποιήθηκε σε Daphnia *magna*. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αποδειχτούν χρήσιμα για τη σωστή επιλογή μιας σειράς συγκεντρώσεων για τις δοκιμασίες αναπαραγωγής. Πρέπει επίσης να είναι γνωστές η διαλυτότητα στο νερό και η τάση ατμών της δοκιμαζόμενης ουσίας, καθώς και μια αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ουσίας στα διαλύματα, της οποίας (μεθόδου) να αναφέρονται συντελεστής ανάκτησης και όριο προσδιορισμού.

Πληροφορίες για την ουσία οι οποίες ενδέχεται να αποδειχτούν χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών της δοκιμασίας είναι ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η σταθερότητα στο φως, η σταθερότητα στις συνθήκες της δοκιμασίας, οι συντελεστές pKa, P_{ow} και τα αποτελέσματα μιας δοκιμασίας μελέτης της ευχέρειας βιοαποικοδομησης (βλέπε μέθοδο Γ.4).

1.5. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Δοκιμασία θεωρείται έγκυρη εφόσον διαπιστωθεί κατόπιν ελέγχων ότι ικανοποιούνται τα ακόλουθα δύο κριτήρια:

— η θνησιμότητα των γεννητόρων (θηλυκά *Daphnia)* δεν υπερβαίνει ποσοστό 20 % στο τέλος της δοκιμασίας,

— ο μέσος όρος ζώντων απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας είναι > 60.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. **Συσκευές και όργανα**

Δοχεία και άλλα όργανα που θα έλθουν σε άμεση επαφή με τα διαλύματα πρέπει να είναι εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο υλικό χημικώς αδρανές. Τα δοχεία είναι κατά κανόνα γυάλινα κύπελλα.

Θα χρειαστεί επιπλέον ο παρακάτω εξοπλισμός ή μέρος αυτού;

— οξυγονόμετρο (με μικροηλεκτρόδιο ή άλλο εξοπλισμό μέτρησης διαλελυμένου οξυγόνου σε δείγματα μικρού όγκου),

▼B

— κατάλληλη συσκευή παρακολούθησης της θερμοκρασίας,

— πεχάμετρο,

— εξοπλισμός προσδιορισμού της σκληρότητας του νερού,

— εξοπλισμός προσδιορισμού της συγκέντρωσης ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) στο νερό ή εξοπλισμός προσδιορισμού του νημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD),

— κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο του φωτισμού και τη μέτρησης της έντασης του φωτός.

1.6.2. **Δοκιμαζόμενα είδη**

Το είδος που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία ονομάζεται Daphnia *magna* Straus. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν κι άλλα είδη *Daphnia,* υπό τον ότι ανταποκρίνονται στα κριτήρια εγκυρότητας κατά περίπτωση (το κριτήριο εγκυρότητας το σχετικό με τις αναπαραγωγικές επιδόσεις των μαρτύρων πρέπει να ανταποκρίνεται στα είδη Daphnia). Αν χρησιμοποιηθούν άλλα είδη Daphnia. πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς και να αιτιολογείται η επιλογή τους.

Η ταυτοποίηση του κλώνου προτιμότερο είναι να γίνεται με βάση τον γονότυπο. Η έρευνα (1) έδειξε ότι οι αναπαραγωγικές επιδόσεις του κλώνου A [ο οποίος προερχόταν από το IRCHA (Institut national de recherche chimique appliquée) της Γαλλίας] (3) ανταποκρίνονται στο κριτήριο εγκυρότητας που απαιτεί να είναι ≥ 60 ο μέσος όρος απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα, στις συνθήκες της περιγραφόμενης μεθόδου. Γίνονται όμως δεκτοί κι άλλοι κλώνοι, αρκεί να αποδειχτεί ότι η καλλιέργεια των Daphnia ανταποκρίνεται στα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμασίας.

Στο ξεκίνημα της δοκιμασίας, τα ζώα θα πρέπει να είναι ηλικίας μικρότερης των 24 ωρών και να μην είναι απόγονοι πρώτης γενιάς. Πρέπει επίσης να προέρχονται από υγιή παρτίδα (να μην εμφανίζουν δηλαδή σημάδια στρες όπως υψηλή θνησιμότητα, παρουσία αρσενικών και εφιππίων, καθυστέρηση στην παραγωγή της πρώτης γενιάς, αποχρωματισμένα ζώα, κ.λπ.'). Τα προς δοκιμασία ζώα πρέπει να διατηρούνται σε συνθήκες καλλιέργειας (φωτισμός, θερμοκρασία, μέσο, διατροφή και αριθμός ζώων ανά μονάδα όγκου) όμοιες με τις συνθήκες υπό τις οποίες θα γίνει η δοκιμασία. Εάν το μέσο που θα χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια των *Daphnia* στο πλαίσιο της δοκιμασίας είναι άλλο από το χρησιμοποιούμενο σε τρέχουσες καλλιέργειες Daphnia, η ορθή πρακτική υπαγορεύει να προηγηθεί ένα χρο-νικό διάστημα εγκλιματισμού τριών κανονικά εβδομάδων (μιας γενεάς δηλαδή), ώστε να αποφευχθει το στρες στους γεννήτορες.

1.6.3. **Μέσο της δοκιμασίας**

Συνιστάται η χρησιμοποίηση ενός μέσου επακριβώς καθορισμένου. Αποφεύγεται έτσι η χρήση προσθέτων (π.χ. φύκη, εκχυλίσματα χώματος, κ,λπ.), που δύσκολα περιγράφονται, με αποτέλεσμα να βελτιώνονται οι δυνατότητες τυποποίησης μεταξύ εργαστηρίων. Μέσα κατάλληλα προς τούτο θεωρούνται τα Elendt M4 (4) και M7 (βλέπε προσάρτημα 1). Αποδεκτά είναι όμως κι άλλα μέσα [π.χ. (5) (6)], αρκεί οι επιδόσεις της καλλιέργειας *Daphnia* αποδεδειγμένα να ανταποκρίνονται στα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμασίας.

Εάν στο μέσο της καλλιέργειας χρησιμοποιηθούν πρόσθετα, τα τελευταία θα πρέπει να προσδιορίζονται με σαφήνεια, και στην έκθεση της δοκιμασίας να δίδονται πληροφορίες για τη σύνθεση τους, αναφορικά κυρίως με την περιεκτικότητα σε άνθρακα, αφού το δεδομένο αυτό μπορεί να ληφθεί υπόψη για τον καθορισμό της διατροφής. Συνιστάται να προσδιορίζεται ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) ή/και το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD) του κυρίως παρασκευάσματος με το οργανικό πρόσθετο, και να αξιολογείται η προκύπτουσα περιεκτικότητα του μέσου της δοκιμασίας σε TOC/COD. Οι τιμές TOC στο μέσο (προτού προστεθούν τα άλγη), συνιστάται να μην υπερβαίνουν 2 mg/l (7).

▼B

Όταν οι υπό δοκιμή ουσίες περιέχουν μέταλλα, είναι σημαντικό να διαπιστώνεται κατά πόσον οι ιδιότητες του μέσου (π.χ. σκληρότητα, ικανότητα σχηματισμού χηλικών ενώσεων) μπορεί να έχουν επίπτωση στην τοξικότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Το μέσο όπου θα γίνει η καλλιέργεια πρέπει λοιπόν να καθορίζεται επακριβώς. Τα μόνα όμως επακριβώς καθορισμένα μέσα που διατίθενται σήμερα για μακροπρόθεσμες καλλιέργειες Daphnia *magna* είναι τα Elendt M4 και M7. Περιέχουν και τα δύο τον χηλικό παράγοντα EDTA. Έχει αποδειχτεί (2) ότι η «φαινόμενη τοξικότητα» του καδμίου είναι κατά κανόνα χαμηλότερη όταν για τη δοκιμασία αναπαραγωγής χρησιμοποιούνται τα μέσα M4 ανδ M7, παρά όταν χρησιμοποιούνται μέσα που δεν περιέχουν EDTA. Ετσι τα μέσα M4 και M7 δεν συνιστώνται για δοκιμαζόμενες ουσίες που περιέχουν μέταλλα, καθώς επίσης πρέπει να αποφεύγονται και άλλα μέσα που περιέχουν γνωστούς χηλικούς παράγοντες. Για ουσίες που περιέχουν μέταλλα, είναι ίσως σκόπιμο να χρησιμοποιείται ένα εναλλακτικό μέσο π.χ. σκληρό γλυκό νερό που έχει ανασυσταθεί με βάση τις υποδείξεις ASTM (7), που δεν περιέχει EDTA, και στο οποίο έχει προστεθεί εκχύλισμα φυκών (8). Ο συνδυασμός τέτοιου σκληρού γλυκού νερού (ASTM) με εκχύλισμα φυκών προσφέρεται και για μακροπρόθεσμες καλλιέργειες και δοκιμασίες *Daphnia magna* (2), παρά το γεγονός ότι έχει κάποια ήπια χηλική δράση οφειλόμενη στα οργανικά συστατικά του προστεθειμένου εκχυλίσματος φυκών.

Κατά την έναρξη της δοκιμασίας αλλά και κατά τη διάρκεια αυτής, η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 3 mg/l. Το pH πρέπει να βρίσκεται στην περιοχή 6-9 και κανονικά να μην μεταβάλλεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδα στη διάρκεια μιας δοκιμασίας. Η σκληρότητα (εκφρασμένη ως $CaCO_3$) συνιστάται να είναι μεγαλύτερη από 140 mg/l. Δοκιμασίες που έγιναν με την τιμή αυτή ή και μεγαλύτερες έδειξαν αναπαραγωγικές επιδόσεις ανταποκρινόμενες στα κριτήρια εγκυρότητας (9) (10).

1.6.4. **Διαλύματα δοκιμών**

Η επιθυμητή συγκέντρωση των δοκιμαστικών διαλυμάτων επιτυγχάνεται συνήθως με αραίωση αρχικού πυκνού διαλύματος. Πυκνά διαλύματα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζονται με διάλυση της ουσίας στο μέσο όπου θα γίνει η δοκιμασία.

Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να είναι απαραίτητη η χρήση οργανικών διαλυτών ή προσθέτων διασποράς ώστε το πυκνό διάλυμα που θα προκύψει να έχει την κατάλληλη συγκέντρωση, πρέπει όμως να καταβληθεί κάθε δυνατή προσπάθεια να μη χρησιμοποιηθούν τέτοια υλικά. Ανάμεσα στους κατάλληλους διαλύτες περιλαμβάνονται η ακετόνη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη, ενώ κατάλληλα πρόσθετα διασποράς είναι το Cremophor RH40, μεθυλοκυτταρίνη 0,01 % και HCO-40. Πάντως, η δοκιμαζόμενη ουσία η περιεχόμενη στα διαλύματα δεν πρέπει να υπερβαίνει το όριο διαλυτότητας στο μέσο όπου γίνεται η δοκιμασία.

Οι διαλύτες χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πυκνού διαλύματος που να προστίθεται με ακρίβεια σε νερό. Στη συνιστώμενη συγκέντρωση του διαλύτη (< 0,1 ml/l) μέσα στο τελικό μέσο της δοκιμασίας, οι διαλύτες που αναφέρονται παραπάνω, δεν πρέπει να είναι ούτε τοξικοί ούτε να αυξάνουν την διαλυτότητα μιας ουσίας στο νερό.

Τα πρόσθετα διασποράς διευκολύνουν την επακριβή δοσομέτρηση και τη διασπορά. Στη συνιστώμενη συγκέντρωση (< 0,1 ml/l) μέσα στο τελικό μέσο της δοκιμασίας, τα πρόσθετα διασποράς που αναφέρονται παραπάνω, δεν πρέπει να είναι ούτε τοξικά ούτε να αυξάνουν την διαλυτότητα μιας ουσίας στο νερό.

▼B

1.7. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΕ ΓΕΝΙΚΕΣ ΓΡΑΜΜΕΣ

Τα παρασκευάσματα τοποθετούνται στα δοχεία και όλοι ο; μετέπειτα χειρισμοί των δοχείων πρέπει να γίνονται κατά τρόπο τυχαίο. Σε αντίθετη περίπτωση, αν σημειωθεί κάποια στρέβλωση, θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως αποτέλεσμα συναρτώμενο με τη συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα, εάν ο χειρισμός των πειραματικών μονάδων γίνεται κατά σειρά συγκέντρωσης, τότε κάποιο φαινόμενο συνδεόμενο με τον χρόνο (π.χ. κόπωση του χαριστή ή τυχόν σφάλμα) θα μπορούσε να πολλαπλασίασει το αποτέλεσμα σε υψηλότερες συγκεντρωσεις. Επιπλέον εάν υπάρχει πιθανότητα επηρεασμού των αποτελεσμάτων της δοκιμασιας από μια αρχική ή περιβαλλοντική συνθήκη (π.χ. θέση στο εργαστήριο) τότε πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο τμηματικής πραγματοποίησης της δοκιμασίας.

1.8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.8.1. **Συνθήκες έκθεσης**

1.8.1.1. *Διάρκεια*

Η διάρκεια της δοκιμασίας είναι 21 ημέρες.

1.8.1.2. *Φορτίο*

Σε κάθε δοχείο, που περιέχει 50-100 ml του μέσου της δοκιμασίας, τοποθετείται ανά ένας γεννήτορας.

Ενδέχεται να χρειαστούν και μεγαλύτεροι όγκοι ώστε να είναι δυνατή η εφαρμογή της ακολουθούμενης αναλυτικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας, μολονότι δεν αποκλείεται και το ενδεχόμενο ανάμειξης διαλυμάτων της ίδιας συγκέντρωσης. Εάν χρησιμοποιηθούν όγκοι μεγαλύτεροι από 100 ml, ενδέχεται να χρειαστεί να αυξηθεί η μερίδα που χορηγείται στα *Daphnia,* ώστε και η διατροφή τους να είναι επαρκής αλλά και για τις ανάγκες εκπλήρωσης των κριτηρίων εγκυρότητας. Σε δοκιμασίες συνεχούς ροής, και για τεχνικούς λόγους, ο σχεδιασμός μπορεί να αλλάξει (να τοποθετηθούν δηλαδή τέσσερις ομάδες των δέκα ζώων σε μεγαλύτερο όγκο), κάθε όμως αλλαγή στον σχεδιασμό της δοκιμασίας πρέπει να αναφέρεται.

1.8.1.3. *Αριθμός ζώων*

Για ημιοτατικές δοκιμασίες, απαιτούνται δέκα τουλάχιστον ζώα που τοποθετούνται ανά ένα σε κάθε συγκέντρωση και δέκα τουλάχιστον ζώα για τη σειρά των μαρτύρων.

Για δοκιμασίες συνεχούς ροής, αποδείχτηκε ότι κατάλληλος αριθμός είναι 40 ζώα σε τέσσερις ομάδες των δέκα για κάθε συγκέντρωση (1). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερος αριθμός ζώων και 20 τουλάχιστον ζώα ανά συγκέντρωση υποδιαιρεμένα σε δύο ή περισσότερες ομάδες με τον ίδιο αριθμό ζώων η καθεμιά (π.χ. τέσσερις ομάδες των πέντα daphnia η καθεμιά). Να σημειωθεί ότι, σε δοκιμασίες όπου τα ζώα τοποθετούνται ομαδικά, δεν είναι δυνατό να εκφραστούν οι αναπαραγωγικές επιδόσεις ως συνολικός αριθμός ζώντων απογόνων ανά ζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας εάν σημειωθούν θάνατοι γεννητόρων. Στις περιπτώσεις αυτές, οι αναπαραγωγικές επιδόσεις πρέπει να εκφραστούν ως «συνολικός αριθμός ζώντων απογόνων ανά γεννήτορα στην αρχή της δοκιμασίας».

1.8.1.4. *Τροφή*

Σε ημιστατικές δοκιμασίες, η παροχή τροφής πρέπει κατά προτίμηση να γίνεται σε ημερήσια βάση, και πάντως τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα (σε συνάρτηση με τις αλλαγές του μέσου). Τυχόν διαφοροποιήσεις (π.χ. σε δοκιμασίες συνεχούς ροής) πρέπει να αναφέρονται.

▼B

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, η τροφή που παρέχεται στους γεννήτορες είναι κατά προτίμηση ζωντανά μονοκύτταρα άλγη ενός ή περισσοτέρων από τα είδη: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* [τώρα *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)] και *Scenedesmus subspicatus*. Η δίαιτα θα πρέπει να βασίζεται στην ποσότητα οργανικού άνθρακα (Ο που παρέχεται σε κάθε γεννήτορα. Η έρευνα (12) έχει δείξει ότι για τα Δαπηνια μαγνα μερίδες μεταξύ 0,1 και 0,2 mg C ανά ζώο ημερησίως αρκούν για να επιτευχθεί ο απαιτούμενος αριθμός απογόνων κατά την έννοια των κριτηρίων εγκυρότητας της δοκιμασίας. Η μερίδα μπορεί να παρέχεται είτε με σταθερό ρυθμό καθ'όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας ή, εάν κριθεί σκόπιμο, με βραδύτερο ρυθμό στην αρχή, που θα αυξάνεται στη συνέχεια όσο θα αναπτύσσονται οι γεννήτορες. Και σ' αυτήν όμως την περίπτωση, η μερίδα πρέπει πάντοτε να παραμένει στην περιοχή τιμών 0,1 έως 0,2 mg C ανά ζώο ημερησίως.

Εάν για πρακτικούς λόγους, όπως π.χ. ο αριθμός κυττάρων αλγών ή η απορρόφηση του φωτός, χρησιμοποιηθούν άλλες παράμετροι (π.χ.) για τον υπολογισμό της απαιτούμενης μερίδας (δεδομένου ότι η μέτρηση της περιεκτικότητας σε άνθρακα είναι χρονοβόρος), κάθε εργαστήριο οφείλει να εκπονήσει το δικό του νομογράφημα σχετικά με την εναλλακτική παράμετρο υπολογισμού της περιεκτικότητας της καλλιέργειας αλγών σε άνθρακα (βλέπε παράρτημα 2 σχετικά με τη χάραξη νομογραφήματος). Τα νομογραφήματα πρέπει να ελέγχονται τουλάχιστον σε ετήσια βάση, συχνότερα δε εάν μεταβληθούν στο μεταξύ οι συνθήκες της καλλιέργειας. Η απορρόφηση του φωτός βρέθηκε ότι υπερτερεί του αριθμού των κυττάρων ως εναλλακτική παράμετρος για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας σε άνθρακα (13).

Στα *Daphnia.* πρέπει να δίδεται ως τροφή συμπυκνωμένο αιώρημα αλγών, ώστε ο όγκος του μέσου με τη καλλιέργεια αλγών που μεταγγίζεται στα δοκιμαστικά δοχεία να είναι ο ελάχιστος δυνατός. Συμπύκνωση των αλγών μπορεί να επιτευχθεί με φυγοκέντρηση και εν συνεχεία επαναιώρηση σε απεσταγμένο νερό, απιονισμένο νερό ή μέσο με καλλιέργεια *Daphnia.*

1.8.1.5. *Φως*

Φωτισμός επί 16 ώρες με ένταση όχι μεγαλύτερη από 15-20 μΕ· m^{-2} · s^{-1}.

1.8.1.6. *Θερμοκρασία*

Η θερμοκρασία των μέσων στα οποία θα γίνει η δοκιμασία πρέπει να βρίσκεται στην περιοχή 1S-22 °C. και, εφόσον είναι δυνατόν, να μην παρουσιάζει διακύμανση μεγαλύτερη από 2 °C στο πλαίσιο μιας και μόνης δοκιμασίας (δηλαδή 18-20, 19-21 ή 20-22 Τ). Για τις ανάγκες παρακολούθησης της θερμοκρασίας, ενδείκνυται ίσως η χρήση ενός επιπλέον δοκιμαστικού δοχείου.

1.8.1.7. *Αερισμός*

Τα δοχεία δεν πρέπει να αερίζονται κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

1.8.2. **Συγκεντρώσεις**

Κανονικά, η δοκιμασία πρέπει να γίνει σε πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεις που 9α διαφέρουν μεταξύ τους κατά συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 3,2 και να γίνει για την κάθε συγκέντρωση ο κατάλληλος αριθμός επαναλήψεων (βλέπε σημείο 1.8.1.3). Εάν η δοκιμασία γίνει σε λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, θα πρέπει να δοθούν εξηγήσεις. Οι ουσίες δεν πρέπει να υπερβαίνουν το όριο διαλυτότητας στο μέσο της δοκιμασίας.

▼B

Για τον καθορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων, πρέπει να ληφθούν υπόψη τα ακόλουθα:

i) προκειμένου για τον υπολογισμό των τιμών LOEC και NOEC, η χαμηλότερη συγκέντρωση πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή ώστε η γονιμότητα σ'αυτήν να μην είναι πολύ χαμηλότερη από την αντίστοιχη της ομάδας των μαρτύρων. Σε αντίθετη περίπτωση, η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί με μειωμένη τιμή χαμηλότερης συγκέντρωσης·

ii) προκειμένου για τον υπολογισμό των τιμών LOEC και NOEC, η υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή ώστε η γονιμότητα σ' αυτήν να είναι πολύ χαμηλότερη από την αντίστοιχη της ομάδας των μαρτύρων. Σε αντίθετη περίπτωση, η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί με αυξημένη τιμή υψηλότερης συγκέντρωσης·

iii) για τον υπολογισμό της τιμής EC_X σχετικά με την επίπτωση στις αναπαραγωγικές επιδόσεις, συνιστάται η χρησιμοποίηση επαρκών συγκεντρώσεων ώστε η EC_X να προσδιοριστεί με επαρκή αξιοπιστία. Για τον υπολογισμό της τιμής EC_{50}, συνιστάται όπως η υψηλότερη συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη από την εν λόγω EC_{50}. Διαφορετικά, μολονότι ο υπολογισμός της EC_{50} θα εξακολουθεί να είναι δυνατός, το διάστημα αξιοπιστίας θα είναι πολύ ευρύ, με ενδεχόμενο αποτέλεσμα να μην μπορεί να αξιολογηθεί ικανοποιητικά η επάρκεια του μοντέλου·

iv) καλό θα ήταν να μην περιλαμβάνονται μεταξύ των συγκεντρώσεων της δοκιμασίας τιμές που να έχουν επίπτωση στατιστικώς σημαντική στην επιβίωση των ενηλίκων ατόμων, αφού κάτι τέτοιο θα αλλοίωνε τον χαρακτήρα της δοκιμασίας και θα την μετέτρεπε από απλή δοκιμασία αναπαραγωγής σε συνδυασμένη δοκιμασία αναπαραγωγής και θνησιμότητας, που θα απαιτούσε πολυπλοκότερη στατιστική ανάλυση.

Εάν η τοξικότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας είναι εκ των προτέρων γνωστή (π.χ. από μελέτες οξείας τοξικότητας ή εντοπισμού εύρους τιμών), διευκολύνεται μάλλον η επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων.

Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης η πρόσθετο διασποράς για την παρασκευή των διαλυμάτων (βλέπε σημείο 1.6.4), η τελική τους συγκέντρωση στα δοχεία δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,1 ml/l, θα πρέπει μάλιστα να είναι η ίδια σε όλα τα δοχεία.

1.8.3. **Μάρτυρες**

Επιπλέον της κανονικής σειράς δοκιμασιών, πρέπει να γίνουν δοκιμασίες με μια σειρά μαρτύρων του δοκιμαστικού μέσου και, εφόσον έχει νόημα, με μια σειρά μαρτύρων που να περιέχουν τον διαλύτη ή το πρόσθετο διασποράς. Η συγκέντρωση του διαλύτη ή του προσθέτου διασποράς πρέπει να είναι η ίδια με την α\τίστοιχη στα δοχεία που περιέχουν τη δοκιμαζόμενη ουσία. Επιπλέον, απαιτείται κατάλληλος αριθμός επαναλήψεων (βλέπε σημείο 1.8.1.3).

Κατά κανόνα, σε μια δοκιμασία που έγινε σωστά, ο συντελεστής διακύμανσης γύρω από τον μέσο αριθμό ζώιτων απογόνων (offspring) ανά γεννήτορα στους μάρτυρες πρέπει να είναι < 25 %, πληροφορία που πρέπει να αναφέρεται όταν πρόκειται για δοκιμασίες κατά τις οποίες τα ζώα τοποθετούνται ανά ένα στα δοχεία.

1.8.4. **Ανανέωση του μέσου**

Η συχνότητα ανανέωσης του μέσου εξαρτάται από τη σταθερότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας, πρέπει πάντως να γίνεται τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα. Εάν από προκαταρκτικές δοκιμασίες μελέτης της σταθερότητας (βλέπε σημείο 1.4) είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν είναι σταθερή (βρίσκεται δηλαδή εκτός των ορίων 80-120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης ή κάτω από το 80 % της αρχικά μετρηθείσας συγκέντρωσης) σε όλη τη διάρκεια της μέγιστης προθεσμίας ανανέωσης (δηλαδή τρεις ημέρες), πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο να ανανεώνεται συχνότερα το μέσο ή η δοκιμασία να είναι συνεχούς ροής.

▼B

Όταν γίνεται ανανέωση του μέσου σε ημιοτατικές δοκιμασίες, ετοιμάζεται μια δεύτερη σειρά δοκιμαστικών δοχείων, ότου μεταφέρονται σ' αυτά οι γεννήτορες με γυάλινο σωλήνα κατάλληλης διαμέτρου (για παράδειγμα). Ο όγκος του μέσου που μεταφέρεται μαζί με τα *Daphnia* πρέπει να είναι ο ελάχιστος δυνατός.

1.8.5. **Παρατηρήσεις**

Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων καταγράφονται σε πίνακες (βλέπε προσαρτήματα 3 και 4). Αν χρειαστεί να γίνουν κι άλλες μετρήσεις (βλέπε 1.3 και 1.8.8), θα υπάρξουν ενδεχομένως κι άλλες παρατηρήσεις.

1.8.6. **Απόγονοι**

Οι απόγονοι (offspring) οι παραγόμενοι από κάθε γεννήτορα είναι προτιμότερο να καταμετρούνται και να απομακρύνονται σε ημερήσια βάση, αμέσως μόλις εμφανιστεί η πρώτη γονή, ώστε να μην καταναλώσουν τροφή προοριζόμενη για τους γεννήτορες. Για τις ανάγκες αυτής της μεθόδου, καταμετρούνται μόνο οι ζώντες απόγονοι (offspring), καταγράφονται όμως τα αβγά των οποίων δεν ολοκληρώθηκε η ανάπτυξη καθώς και οι νεκροί απόγονοι (offspring).

1.8.7. **Θνησιμότητα**

Η θνησιμότητα των γεννητόρων καταγράφεται σε ημερήσια κατά προτίμηση βάση, και τουλάχιστον κάθε φορά που καταμετρούνται οι απόγονοι (offspring).

1.8.8. **Άλλες παράμετροι**

Μολονότι η υπόψη μέθοδος αποβλέπει κατά κύριο λόγο σε μελέτη των επί της αναπαραγωγής επιπτώσεων, ενδέχεται να παρατηρηθούν κι άλλες επιπτώσεις ποσοτικώς μετρήσιμες ώστε να έχει νόημα η στατιστική τους ανάλυση. Οι μετρήσεις που αφορούν την ανάπτυξη παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, γιατί δίνουν πληροφορίες για ενδεχόμενες επιπτώσεις σχεδόν θανατηφόρες, και με την έννοια αυτή ενδέχεται να είναι πιο χρήσιμες από τις μετρήσεις μόνο των επιπτώσεων στην αναπαραγωγή. Συνιστάται η μέτρηση του μήκους των γεννητόρων (μήκος του σώματος χωρίς την εδρική άκανθα) στο τέλος της δοκιμασίας. Αλλες παράμετροι που μπορούν να μετρηθούν ή να υπολογιστούν είναι ο χρόνος μέχρις ότου παραχθεί η πρώτη γονή (και οι επόμενες), πόσες φορές γεννάει κάθε γεννήτορας και πόσους απογόνους κάθε φορά, ο αριθμός των αβγών των οποίων δεν ολοκληρώθηκε η ανάπτυξη, η παρουσία αρσενικών ή εφιπ-πίων και ο πραγματικός ρυθμός αύξησης του πληθυσμού.

1.8.9. **Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων**

Η συγκέντρωση του οξυγόνου, η θερμοκρασία, η σκληρότητα και το pH πρέπει να μετρούνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, πριν και μετά την ανανέωση του μέσου, στους μάρτυρες και στην υψηλότερη συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, οι συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας προσδιορίζονται σε τακτά διαστήματα.

Σε ημιστατικές δοκιμασίες όπου η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας αναμένεται να μεταβάλλεται κατά ± 20 % σε σχέση με την ονομαστική (να κυμαίνεται δηλαδή εντός των ορίων 80-120 % — βλέπε 1.4 και 1.8.4), συνιστάται να προσδιορίζονται τουλάχιστον η υψηλότερη και η χαμηλότερη συγκέντρωση αμέσως μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα και με την ευκαιρία μιας ανανέωσης μέσα στην πρώτη εβδομάδα της δοκιμασίας (οι μετρήσεις δηλαδή πρέπει να γίνονται σε δείγματα του ίδιου διαλύματος, μία φορά μόλις παρασκευαστούν και μια δεύτερη μόλις ανανεωθούν). Στη συνέχεια, οι μετρήσεις αυτές πρέπει να επαναλαμβάνονται σε εβδομαδιαία τουλάχιστον βάση.

▼B

Σε δοκιμασίες όπου η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας αναμένεται να κυμαίνεται εντός των ορίων ± 20 % σε σχέση με την ονομαστική τιμή, είναι ανάγκη να προσδιορίζονται όλες οι συγκεντρώσεις, αμέσως μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα και κατά την ανανέωση. Εντούτοις, σε δοκιμασίες όπου η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν κυμαίνεται εντός του ± 20 % σε σχέση με την ονομαστική τιμή και εφόσον μπορεί να αποδειχτεί ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις είναι επαναληπτικές και σταθερές (κυμαίνονται δηλαδή μέσα στα όρια 80-120 % των αρχικών συγκεντρώσεων), οι μετρήσεις κατά τη διάρκεια της δεύτερης και της τρίτης εβδομάδας της δοκιμασίας μπορούν να περιοριστούν στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας πριν την ανανέωση χρειάζεται να γίνεται μόνο σε ένα δοχείο, σπό αυτά που χρησιμοποιούν για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης.

Σε δοκιμασία συνεχούς ροής. ενδείκνυται καθεστώς δειγματοληψίας ανάλογο με το περιγραφόμενο για ημιοτατικές δοκιμασίες (στην περίπτωση όμως αυτή δεν ισχύουν οι μετρήσεις «παλαιών» διαλυμάτων). Εντούτοις, καλό θα ήταν να αυξηθεί ο αριθμός των δειγματοληψιών στη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας (π.χ. τρεις σειρές μετρήσεων) ώστε να είναι βέβαιο ότι οι συγκεντρώσεις παραμένουν σταθερές. Σε δοκιμασίες αυτού του τύπου, ο ρυθμός ροής του μέσου αραίωσης και της δοκιμαζόμενης ουσίας πρέπει να ελέγχονται καθημερινά.

Εάν μπορεί να αποδειχτεί ότι η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας κυμάνθηκε στη διάρκεια της δοκιμασίας κατά ± 20 % σε σχέση με την ονομαστική ή την αρχικώς μετρηθείσα, τότε τα αποτελέσματα μπορούν να βασιστούν στις ονομαστικές ή τις αρχικώς μετρηθείσες τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή την αρχικώς μετρηθείσα συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη από ± 20 %, τα αποτελέσματα πρέπει να εκφραστούν ως μέσος όρος συναρτήσει του χρόνου (βλέπε προσάρτημα 5).

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η εν λόγω δοκιμασία αποσκοπεί σε προσδιορισμό των επιπτώσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας επί του συνολικού αριθμού ζώντων απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας. Ο συνολικός αριθμός ζώντων απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα πρέπει να υπολογίζεται για κάθε δοχείο (με την ίδια συγκέντρωση). Εάν κατά τη διάρκεια δοκιμασίας ο γεννήτορας πεθάνει ή αποδειχτεί αρσενικό άτομο, το συγκεκριμένο δοχείο εξαιρείται από την ανάλυση, η οποία και θα βασιστεί σε μειωμένο αριθμό δοχείων της ίδιας συγκέντρωσης.

Για τον προσδιορισμό της LOEC, και συνεπώς της NOEC (για τις επιπτώσεις της χημικής ουσίας στις αναπαραγωγικές επιδόσεις), πρέπει να υπολογιστεί ο μέσος όρος των αναπαραγωγικών επιδόσεων επί όλων των δοχείων της ίδιας συγκέντρωσης και η συνολική παραμένουσα τυπική απόκλιση, πράγμα που μπορεί να γίνει με ανάλυση διασποράς (ANOVA). Ο μέσος όρος που αντιστοιχεί σε κάθε συγκέντρωση συγκρίνεται στη συνέχεια με τον μέσο όρο που αντιστοιχεί στους μάρτυρες, με τη βοήθεια κατάλληλης μεθόδου πολλαπλών συγκρίσεων. Ενδείκνυνται ενδεχομένως οι δοκιμασίες Dunnett ή Williams (14) (15) (16) (17). Είναι ανάγκη να εξακριβώνεται κατά πόσον ευσταθεί η υπόθεση (της ανάλυσης ANOVA) περί ομοιογένειας της διασποράς. Συνιστάται μάλιστα αυτό να γίνεται με γραφική παράσταση μάλλον παρά με έναν τυπικό έλεγχο σημαντικότητας (18)· πρόσφορη εναλλακτική λύση είναι μια δοκιμασία Bartlett. Εάν διαπιστωθεί ότι η υπόθεση αυτή δεν ευσταθεί, τότε πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο μετατροπής των δεδομένων ώστε να ομογενοποιηθούν οι διασπορές προτού γίνει ανάλυση διασποράς (ANOVA), ή να γίνει μια σταθμισμένη ανάλυση διασποράς (ANOVA). Υπολογίζεται και καταγράφεται ο βαθμός επίπτωσης που μπορεί να εντοπιστεί μέσω ANOVA (ήτοι η ελάχιστη σημαντική διαφορά).

▼B

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση που έχει ως αποτέλεσμα μείωση των αναπαραγωγικών επιδόσεων κατά 50 % (δηλαδή η EC_{50}), μια κατάλληλη καμπύλη, όπως η λογιστική καμπύλη, πρέπει να προσαρμοστεί στα δεδομένα με τη βοήθεια στατιστικής μεθόδου, όπως είναι η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων. Η καμπύλη μπορεί να γίνει παραμετρική ώστε να μπορούν να προσδιοριστούν απευθείας η EC_{50} και το τυπικό σφάλμα αυτής. Διευκολύνεται έτσι σε μεγάλο βαθμό ο υπολογισμός του ορίου εμπιστοσύνης της EC_{50}. Καθορίζεται αμφίπλευρο όριο εμπιστοσύνης 95 %, εκτός εάν υπάρχουν βάσιμοι λόγοι να καθοριστεί άλλο. Η διαδικασία προσαρμογής καλό είναι να επιτρέπει να αξιολογείται ο βαθμός έλλειψης προσαρμογής. Αυτό μπορεί να γίνει με γραφική παράσταση ή με διαχωρισμό του αθροίσματος των τετραγώνων σε «έλλειψη προσαρμογής» και σε «συνιστώσες καθαρού σφάλματος» και με πραγματοποίηση ελέγχου σημαντικότητας της έλλειψης προσαρμογής. Αφού τα διαλύματα που συμβάλλουν σε υψηλή γονιμότητα αναμένεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη διασπορά του αριθμού παραγόμενων απογόνων (juveniles) από εκείνα που συμβάλλουν σε χαμηλή γονιμότητα, πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο στάθμισης των παρατηρούμενων τιμών κατά τρόπο ώστε να απηχούν τις διαφορές που εμφανίζουν οι διάφορες ομάδες ως προς τη διασπορά [βλέπε (18)].

Κατά την ανάλυση των δεδομένων της τελικής δοκιμασίας δακτυλίου (2), χαράχτηκε μια λογιστική καμπύλη με τη βοήθεια του παρακάτω μοντέλου, μολονότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν κι άλλα μοντέλα:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

όπου:

Y: ο συνολικός αριθμός απογόνων (juveniles) ανά ζώντα γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας (υπολογιζόμενος για κάθε δοχείο χωριστά),

x: η συγκέντρωση της ουσίας,

c: ο αναμενόμενος αριθμός απογόνων (juveniles) όταν $\chi = 0$,

x_0: η EC_{50} στον πληθυσμό,

b: η κλίση της καμπύλης.

Το μοντέλο αυτό μπορεί να καλύψει μεμάλο αριθμό καταστάσεων, υπάρχουν όμως και δοκιμασίες για τις οποίες δεν ενδείκνυται. Η καταλληλότητα του ως άνω μοντέλου πρέπει να ελέγχεται. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να ενδείκνυται ένα μοντέλο (hormesis model στο οποίο χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν αυξημένη επίπτωση (19).

Μπορούν επίσης να προσδιοριστούν κι άλλες συγκεντρώσεις που έχουν επίπτωση στην αναπαραγωγή, όπως ο; EC_{10} και EC_{20}. αν και είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές παράμετρο; από εκείνες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της EC_{50}.

2.2. ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1. **Δοκιμαζόμενη ουσία:**

— φυσικές ιδιότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες που άπτονται της δοκιμασίας,

▼B

— χημικά χαρακτηριστικά, μεταξύ των οποίων η καθαρότητα.

2.2.2. **Δοκιμαζόμενο είδος:**

— ο κλώνος (διευκρινίζεται κατά πόσον έχει προσδιοριστεί ο γονότυπος του), προμηθευτής ή πηγή (εάν είναι γνωστά) και συνθήκες καλλιέργειας. Εάν χρησιμοποιηθεί είδος άλλο από τα Daphnia *magna,* αναφέρεται και αιτιολογείται.

2.2.3. **Συνθήκες της δοκιμασίας:**

— ακολουθούμενη διαδικασία (ημιστατική ή συνεχούς ροής, όγκος, φορτίο = αριθμός *Daphnia* ανά λίτρο),

— φωτοπερίοδος και ένταση του φωτός,

— συνοπτική περιγραφή της δοκιμασίας (π.χ. αριθμός δοχείων με την ίδια συγκέντρωση, αριθμός γεννητόρων ανά δοχείο),

— λεπτομερείς πληροφορίες για το μέσο-όπου γίνεται η καλλιέργεια,

— τυχόν προστιθέμενες οργανικές ύλες (σύνθεση, πηγή προέλευσης, μέθοδος παρασκευής), TOC/COD των πυκνών διαλυμάτων, προσδιορισμός TOC/COD στο μέσο όπου γίνεται η δοκιμασία,

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την παροχή τροφής [ποσότητα σε mg C/*Daphnia* ημερησίως, είδος τροφής (εάν πρόκειται για φύκη, ονομασίες των ειδών, και, εάν είναι γνωστά, το στέλεχος και οι συνθήκες της καλλιέργειας)],

— μέθοδος παρασκευής των πυκνών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (αναφέρονται, εφόσον χρησιμοποιούνται, διαλύτης και πρόσθετο διασποράς και σε τι συγκέντρωση).

2.2.4. **Αποτελέσματα:**

— αποτελέσματα τυχόν προκαταρκτικών μελετών σχετικά με τη σταθερότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας,

— ονομαστικές συγκεντρώσεις και αποτελέσματα όλων των αναλύσεων προσδιορισμού της συγκέντρωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας στα δοκιμαστικά δοχεία (βλέπε πίνακες προσαρτήματος 4)· αναφέρονται επίσης συντελεστής ανάκτησης της μεθόδου και όριο προσδιορισμού,

— ποιότητα του νερού στα δοκιμαστικά δοχεία (pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου, TOC ή/και COD και σκληρότητα κατά περίπτωση) (βλέπε πίνακα προσαρτήματος 3),

— πλήρης καταγραφή ζώντων απογόνων (offspring) ανά γεννήτορα (βλέπε πίνακα προσαρτήματος 3),

— αριθμός θανάτων μεταξύ των γεννητόρων και ημέρα κατά την οποία σημειώθηκαν (βλέπε πίνακα προσαρτήματος 3),

— συντελεστής διακύμανσης για τον έλεγχο γονιμότητας [βάση του συνολικού αριθμού ζώντων απογόνων (offspring) ανά γεννήτορα στο τέλος της δοκιμασίας],

— γραφική παράσταση του συνολικού αριθμού ζώντων απογόνων (offspring) ανά ζώντα γεννήτορα (για κάθε συγκέντρωση διαλύματος) στο τέλος της δοκιμασίας συναρτήσει της συγκέντρωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας,

— η ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίπτωσης (LOEC) στην αναπαραγωγή (συμπεριλαμβάνονται περιγραφή των στατιστικών μεθόδων που εφαρμόζονται και ενδεικτική αναφορά ως προς τον πιθανό βαθμό επίπτωσης) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίπτωσης (NOEC) στην αναπαραγωγή· αναφέρονται κατά περί-πτωση οι τιμές LOEC και NOEC για τη θνησιμότητα των γεννητόρων,

▼B

— κατά περίπτωση, η τιμή της συγκέντρωσης EC_X νια την αναπαραγωγή και το όριο εμπιστοσύνης και γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιείται νια τον υπολογισμό της, η κλίση της καμπύλης δόσης-απόκρισης και το τυπικό σφάλμα,

— άλλες βιολογικές επιπτώσεις και μετρήσεις: αναφέρονται τυχόν άλλες βιολογικές επιπτώσεις που παρατηρήθηκαν ή μετρήθηκαν (π.χ. ανάπτυεη των γεννητόρων), συνοδευόμενες από τυχόν εξήγηση.

— αιτιολόγηση κάθε παρέκκλισης από τη μέθοδο της δοκιμασίας.

3. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the Daphnia *magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D. J., Barber J., Bradley M. C, Soares A. M. V. M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, pp. 257-265.

(4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, pp. 25-33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. 1. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L.. (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, pp. 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(8) Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Lokke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), pp. 144-148.

(9) Parkhurst B. R., Forte J. L. and Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. and Toxicol, 26, pp. 1-8.

(10) Cowgill U. M. and Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol, 120(2), pp. 185-196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I. R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, pp. 2053-2058.

▼B

(13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, pp. 459-466.

(14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(16) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, pp. 510-531.

(18) Draper N. R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, pp. 93-96.

(20) Wilson E. O. and Bossert, W. H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R. W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, pp. 5 32.

(22) Meyer J. S., Ingersoll C. G., McDonald L. L. and Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, pp. 1156-1166.

▼B

Προσαρτημα 1

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΜΕΣΩΝ ELENDT M7 ΚΑΙ M4 ΕΠΑΚΡΙΒΩΣ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ

Εγκλιματισμός των Daphnia στο Elendt M7 ανδ M4

Μερικά εργαστήρια αντιμετώπισαν δυσκολίες κατά την άμεση μεταφορά *Daphnia* στα μέσα M4 (1) και M7, οι οποίες όμως ξεπεράστηκαν σε κάποιο βαθμό με σταδιακό εγκλιματισμό, με μεταφορά δηλαδή από το μέσον στο οποίο βρισκόντουσαν σε συγκέντρωση 30 %, στη συνέχεια σε συγκέντρωση 60 % και κατόπιν σε 100 %. Ο εγκλιματισμός μπορεί να διαρκέσει έως και ένα μήνα.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

Ιχνοστοιχεία

Παρασκευάζονται πρώτα σε νερό κατάλληλης καθαρότητας (π.χ. απιονισμένο, απεσταγμένο ή αντίστροφης όσμωσης) ξεχωριστά πυκνά διαλύματα (I) μεμονωμένων ιχνοστοιχείων. Από τα διαφορετικά αυτά πυκνά διαλύματα (I) παρασκευάζεται ένα δεύτερο ενιαίο πυκνό διάλυμα (Π), το οποίο περιέχει όλα τα ιχνοστοιχεία (συνδυασμένη λύση), ήτοι:

Πυκνά διαλύματα I (μία ουσία)	Ποσότητα που προστίθεται στο νερό mg/l	Συγκέντρωση (συγκριτικά με το μέσο M4) (φορές)	Για την παρασκευή του συνδυασμένου πυκνού διαλύματος Π, προστίθεται σε νερό η εξής ποσότητα πυκνού διαλύματος I mg/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2$ * 4 H_2O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2$ * 6 H_2O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na_2MoO_4 * 2 H_2O	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2$ * 2 H_2O	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CuCl_2$ * 6 H_2O	200	20 000	1,0	1,0
Kl	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2EDTA * 2 H_2O	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4$ * 7 H_2O	1 991	2 000	—	—

Τα διαλύματα Na_2EDTA και $FeSO_4$ παρασκευάζονται χωριστά το καθένα στη συνέχεια αναμειγνύονται και αποστειρώνονται αμέσως σε αυτόκλειστο και το αποτέλεσμα είναι:

Διάλυμα 21 Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0

▼B

Μέσα M4 και M7

Παρασκευάζονται με πυκνό διάλυμα II, μακροθρεπτικές ύλες και βιταμίνες ως εξής:

	Ποσότητα που προστίθεται στο νερό mg/l	Συγκέντρωση (συγκριτικά με το μέσο M4) (φορές)	Ποσότητα πυκνού διαλύματος που προστίθεται για την παρασκευή του μέσου ml/l	
			M 4	M 7
Πυκνό διάλυμα II συνδυασμός ιχνοστοιχείων		20	50	50
Πυκνά διαλύματα με μακροθρεπτικές ύλες (μία ουσία)				
$CaCl_2$ * 2 H_2O	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ * 7 H_2O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2SiO_3 * 9 H_2O	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Πυκνό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών	—	10 000	0,1	0,1
Το πυκνό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών παρασκευάζεται με προσθήκη των τριών βιταμινών σε 1 λίτρο νερού ως εξής:				
Υδροχλωρική θειαμίνη	750	10 000	—	—
Κυανοκοβαλαμίνη (B_{12})	10	10 000	—	—
Βιοτίνη	7,5	10 000	—	—

Το πυκνό διάλυμα συνδυασμού βιταμινών αποθηκεύεται κατεψυγμένο, σε μικρά μερίδια. Οι βιταμίνες προστίθενται στα μέσα λίγο πριν τη χρήση

Σημειώσεις Προς αποφυγή καθίζησης αλάτων κατά τη διαδικασία παρασκευής του πλήρους μέσου, προστίθενται οι ποσότητες των πυκνών διαλυμάτων σε 500-800 ml απιονισμένου νερού και εν συνεχεία ο όγκος συμπληρώνεται μέχρις ενός λίτρου.

Η πρώτη δημοσίευση σχετικά με το M4 βρίσκεται στο Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, σ.σ. 25-33.

▼B

Προσαρτημα 2

ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ (TOC) ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΝΟΜΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΛΓΩΝ ΤΡΟΦΗΣ ΣΕ TOC

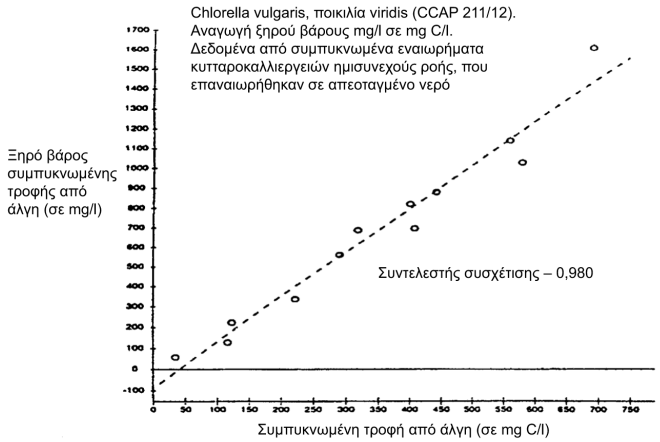
Η περιεκτικότητα σε άνθρακα των αλγών που χρησιμοποιούνται ως τροφή δεν μπορεί κανονικά να μετρηθεί απευθείας αλλά έμμεσα με τη βοήθεια νομογραφημάτων, όπου χρησιμοποιούνται ως παράμετροι ο αριθμός των κυττάρων ή η απορρόφηση του φωτός.

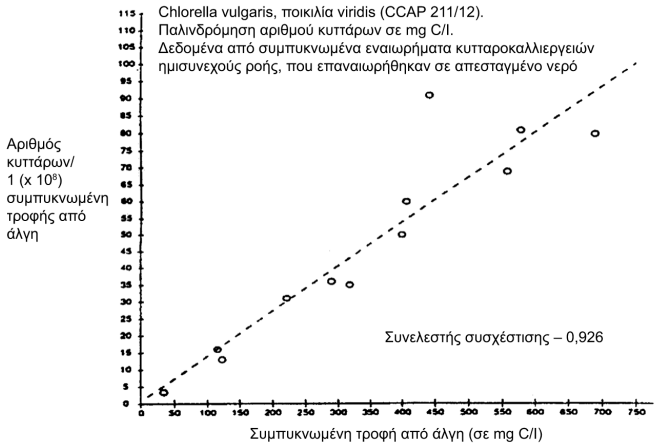
Ο προσδιορισμός του TOC πρέπει να γίνεται με τη μέθοδο της οξείδωσης σε υψηλή θερμοκρασία μάλλον παρά με άλλες μεθόδους όπως με τη μέθοδο της υπεριώδους ακτινοβολίας ή τη μέθοδο του υπερθειικού (βλέπε: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinants 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Για τη χάραξη του νομογραφήματος, τα άλγη διαχωρίζονται από το μέσο της καλλιέργειας με φυγοκέντρηση και εν συνεχεία επαναιώρηση σε απεσταγμένο νερό. Μετράται η εναλλακτική παράμετρος και η συγκέντρωση TOC σε κάθε δείγμα τρεις φορές. Αναλύονται τα τυφλά διαλύματα που περιέχουν απεσταγμένο νερό και η συγκέντρωση TOC συνάγεται από την αντίστοιχη του δείγματος με τα άλγη.

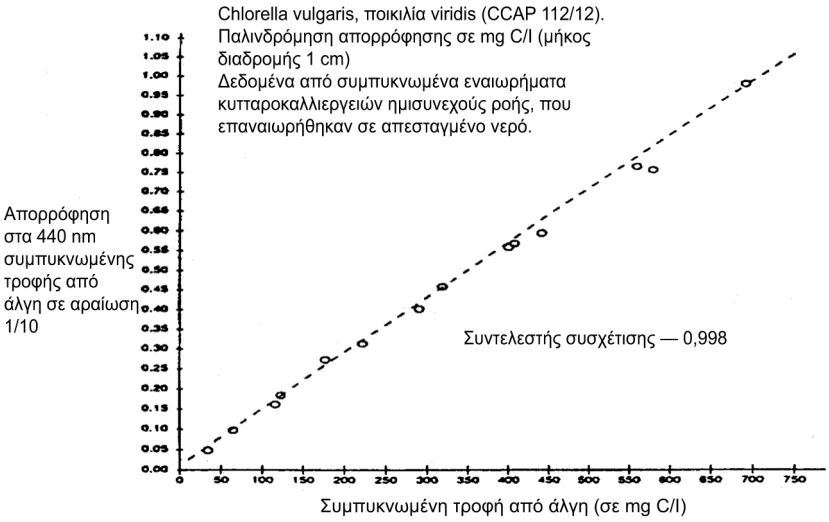
Η γραμμή του νομογραφήματος πρέπει να είναι ευθεία στην περιοχή των συγκεντρώσεων άνθρακα που ενδιαφέρουν. Σχετικά παραδείγματα δίνονται στη συνέχεια.

Σημείωση: Τα νομογραφήματα που ακολουθούν δεν προσφέρονται για μετατροπές. Τα εργαστήρια χαράσσουν τα δικά τους νομογραφήματα.





▼B


Chlorella vulgaris, ποικιλία viridis (CCAP 112/12).
Παλινδρόμηση απορρόφησης σε mg C/l (μήκος διαδρομής 1 cm)
Δεδομένα από συμπυκνωμένα εναιωρήματα κυτταροκαλλιεργειών ημισυνεχούς ροής, που επαναιωρήθηκαν σε απεσταγμένο νερό.
Απορρόφηση στα 440 nm συμπυκνωμένης τροφής από άλγη σε αραίωση 1/10
Συντελεστής συσχέτισης — 0,998
Συμπυκνωμένη τροφή από άλγη (σε mg C/l)

▼B

Προσαρτημα 3

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΦΥΛΟΥ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΟΠΟΥ ΚΑΤΑΓΡΑΦΟΝΤΑΙ Η ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕΣΟΥ, ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ, Η ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΗ ΤΡΟΦΗ, Η ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ DAPHNIA ΚΑΙ Η ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Αρ. Πειράματος.:	Ημερομηνια έναρξης:				Κλώνος:				Μέσο				Είδος τροφής:				Δοκιμαζόμενη ουσία:				Ονομαστικές συγκενιρώσεις:			
Ημέρα	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Ανανέωση του μέσου (να σημειωθεί)																								
PH (1)																							νέα τιμή	
																							παλιά τιμή	
O_2 mg/l (1)																							νέα τιμή	
																							παλιά τιμή	
Θερμοκρασία (°C) (1)																							νέα τιμή	
																							παλιά τιμή	
Παρεχόμενη τροφή (να σημειωθεί)																								
Αριθμός ζωώνιων απογόνων (2)																								Σύνολο
Λοχείο 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

2008R0440 — EL — 22.03.2014 — 004.001 — 1124

▼B

Αρ. Πειράματος.:	Ημερομηνια έναρξης:				Κλώνος:				Μέσο				Είδος τροφής:				Δοκιμαζόμενη ουσία:				Ονομαστικές συγκενιρώσεις:			
Ημέρα	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Σύνολο	
Συνολική θνησιμότητα ενηλίκων ([3])																								

([1]) Σημειώνεται ποιό δοχείο χρησιμοποιήθηκε για τα πείραμα.
([2]) Καταγράφειαι ως «Θ» στην αντίσιοιχη θέση τυχόν θνησιμότητα ενηλίκων ατόμων.
([3]) Καταγράφονται ως «Λ» στην αντισιοιχη θέση τα αβγά των οποίων δεν ολοκληρώθηκε η ανάπτυξη.

▼B

Προσαρτημα 4

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΦΥΛΛΟΥ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

α) **Μετρηθείσες συγκεντρώσεις**

Ονομαστική συγκέντρωση	1η εβδομάδα/δείγμα		2η εβδομάδα/δείγμα		3η εβδομάδα/δείγμα	
	Μετά την ανανέωση	Πριν την ανανέωση	Μετά την ανανέωση	Πριν την ανανέωση	Μετά την ανανέωση	Πριν την ανανέωση

β) **Μετρηθείσες συγκεντρώσεις ως ποσοστό επί της ονομαστικής τιμής**

Ονομαστική συγκέντρωση	1η εβδομάδα/δείγμα		2η εβδομάδα/δείγμα		3η εβδομάδα/δείγμα	
	Μετά την ανανέωση	Πριν την ανανέωση	Μετά την ανανέωση	Πριν την ανανέωση	Μετά την ανανέωση	Πριν την ανανέωση

▼B

Προσαρτημα 5

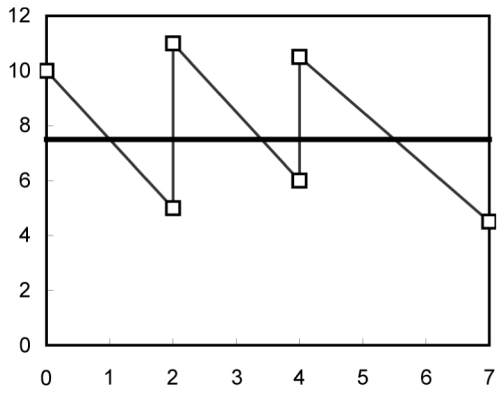
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΜΕΣΟΥ ΟΡΟΥ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Μέσος όρος συναρτήσει του χρόνου

Δεδομένου ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας μπορεί να μειωθεί στο χρονικό διάστημα ανάμεσα σε δύο διαδοχικές ανανεώσεις του μέσου, είναι απαραίτητο να εξετάζεται ποια συγκέντρωση πρέπει να επιλεγεί ως αντιπροσωπευτική της σειράς συγκεντρώσεων στις οποίες εκτίθενται οι γεννήτορες *Daphnia*. Η επιλογή πρέπει να βασιστεί τόσο σε βιολογικά όσο και σε στατιστικά κριτήρια. Εάν για παράδειγμα Θεωρείται ότι η αναπαραγωγή επηρεάζεται περισσότερο από τη μέγιστη συγκέντρωση, τότε χρησιμοποιείται η μέγιστη συγκέντρωση. Εάν όμως θεωρείται ότι υπερισχύει η αθροιστική ή η μακροπρόθεσμη επίπτωση της τοξικής ουσίας, τότε καταλληλότερη είναι μια μέση συγκέντρωση. Σε μια τέτοια περίπτωση, ενδείκνυται να χρησιμοποιηθεί ως μέσος όρος μια μέση τιμή συγκέντρωσης που υπολογίζεται συναρτήσει του χρόνου, αφού συνυπολογίζεται έτσι η χρονική διακύμανση της στιγμιαίας συγκέντρωσης.

Σχήμα 1

Παράδειγμα μέσου όρου συναρτήσει του χρόνου



Στο σχήμα 1 φαίνεται ένα παράδειγμα (απλοποιημένης) δοκιμής διάρκειας 7 ημερών με ανανέωση του μέσου στις ημέρες 0, 2 και 4.

— Η επτή γραμμή (τεθλασμένη) απεικονιζει τη συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου. Η πτώση των τιμών της συγκέντρωσης θεωρείται ότι είναι εκθετική.

— Τα έξι σημεία που διακρίνονται αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν πριν και μετά από κάθε ανανέωση.

— Η παχιά ευθεία απεικονίζει τη θέση του μέσου όρου συναρτήσει του χρόνου.

Ο μέσος όρος συναρτήσει του χρόνου υπολογίζεται κατά τρόπο ώστε το εμβαδόν κάτω από την παχιά ευθεία (μέσος όρος συναρτήσει χρόνου) να ισούται με το εμβαδόν κάτω από την τεθλασμένη (καμπύλη των συγκεντρώσεων). Ο υπολογισμός για το παραπάνω παράδειγμα εμφαίνεται στον πίνακα 1.

▼B

Πίνακας 1

Υπολογισμός του μέσου όρου συναρτήσει του χρόνου (μέσος όρος)

Αύξων αριθμός ανανέωσης	Ημέρες	ConcO	Conc 1	Ln(ConcO)	Ln(Conc 1)	Εμβαδόν
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Σύνολο ημερών: 7					συνολικό εμβαδόν	50,091
					μέσος όρος (TW)	7,156

Ημέρες: η διάρκεια μιας περιόδου ανανέωσης.

ConcO: η συγκέντρωση που μετρείται στην αρχή εκάστης περιόδου ανανέωσης,

Concl: η συγκέντρωση που μετρείται στο τέλος εκάστης περιόδου ανανέωσης.

Ln(ConcO): ο φυσικός λογάριθμος της συγκέντρωσης 0.

Ln(Conc 1): ο φυσικός λογάρι9μος της συγκέντρωσης 1.

Εμβαδόν: το εμβαδόν κάτω από την εκθετική καμπύλη για κά3ε περίοδο ανανέωσης, υπολογιζόμενο βάσει του τύπου:

$$εμβαδόν = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times ημέρες$$

Ο μέσος όρος συναρτήσει του χρόνου (μέσος όρος TW) προκύπτει με διαίρεση του ολικού εμβαδού δια του συνολικού αριθμού ημερών.

Εννοείται ότι για τη δοκιμασία αναπαραγωγής *Daphnia* ο πίνακας επεκτείνεται για να καλύψει 21 ημέρες.

Είναι σαφές ότι όταν γίνεται παρατήρηση στην αρχή μόνο και στο τέλος κάθε περιόδου ανανέωσης, δεν υπάρχει δυνατότητα να επιβεβαιωθεί κατά πόσον η πτώση των τιμών της συγκέντρωσης ακολουθεί όντως εκθετική πορεία. Διαφορετική καμπύλη θα οδηγήσει σε διαφορετικό υπολογισμό του εμβαδού. Εντούτοις, μια εκθετική καμπύλη πτώσης των τιμών δεν αποκλείεται, είναι μάλιστα η προσφορότερη καμπύλη αν δεν υπάρχουν άλλες πληροφορίες.

Προσοχή χρειάζεται σε περίπτωση κατά την οποία δεν ανιχνευτεί καθόλου ουσία στο τέλος της περιόδου ανανέωσης. Είναι αδύνατον να προκύψει κάτω από την καμπύλη ένα εμβαδόν που να ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα, και συνεπώς ένας λογικός μέσος όρος TW, εκτός εάν υπάρχει τρόπος να εκτιμηθεί με τι ρυθμούς εξαφανίστηκε από το διάλυμα η ουσία.

▼B

Γ.21. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΕΔΑΦΟΥΣ: ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΑΖΩΤΟΥ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδοη δοκιμήη αποτελεί αναπαραγετγή της OECD TG 216 (1999).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής περτγράφει εργαστηριακή μέθοδο προοριζόμενη για τη διερεύνηση των μακροπρόθεσμων επιδράσεων χημικών ουσιών, έειτα από εφάπαξ έκθεση, στην ικανότητα μικροργανισμών του εδάφους να μετατρέπουν το άζωτο. Η δοκιμςή αυτή βασίζεται κυριως στις συστάοεις του Ευρωπαϊκού και Μεσογεγεπακού Οργανισμού Φυτοπροστασίας (1). Ωστόσο, ελήφθησαν υπόψη και άλλες κατευθυντήριες οδηγίες, συμπεριλαμβανομένων και εκεινων των German Biologische Bundesastalt (2), του Οργανιομού Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΟΟΣΑ για την επιλογή εδαφών/ιζημάτων, του έγινε στο Belgirate, Ιταλια, το 1995 (6) συμφωνήθηκε ο αριθμός και ο τάπος των προς χρήση εδαφών στην παρούσα σοκιμή. Οι συοτάοεις για τη συλλογή, χειρσμό και αποθήκευση των εδαφικών δετγμάτων βασίξονται οε κείμενο οδηγιών του ISO (7) και συστάσεις από τη συνάντηση του Belgirate. Για την αξιολόγηση και εκτίμηση των τοξικών χαρακτηριστικών των υπό δοκιμή όυσιών, μπορεί να απαττελται προσδιορισμός των επιδράσεων οτη μικροβιακή δρασεικότητα του εδάφους, π.χ. όταν απαιτούνται στοιχεία για τις δυνητικές παρενέργειες προιόντων προστασίας καλλιεργειών στη μικροχλωρίδα του εδάφους ή όταν αναμένεται έκθεση μικροοργανισμών του εδάφους σε άλλες χημικές ουσίες εκτός προϊόντων προστασίας καλλιεργειών. Η σοκιμή μετατροπής του αζώτου πραγματοποιείται για τον προσδιορισμό των επιδράσεων εν λόγξ χημικών στη μικροχλωρίδα του εδάφους. Εφόσον δοκιμάζονται αγροχημικά (π.χ. προιόντα προστασίας καλλιεργειών, λεπάσματα, δασοκομικά χημυκά), πραγματοποιούνται δοκιμές για τη μετατροπή τόσο του αζώτου όσο και του άνθρακα. Εφόσον δεν δοκιμάζονται αγροχημικά, αρκεί η δοκιμή είναι στην περιοχή των τιμών που βρίσκονται για διαθέσιμους οτο εμπόριο αναστολείς νιτροποίησης (π.χ. νιτραπυρίνη), μπορεί να διεξαχθεί και δοκιμή μετατροπής του άνθρακα για την απόκτηση περαιτέρω πληροφοριών.

Τα εδάφη συνίστανται από ζώντα και μη ζώντα συστατικά στοιχεία που υφίστανται σε πολύπλοκα και ετερογενή μιγματα. Οι μικροοργανιομοί παίζουν σηςαντικό ρόλο στη διάσπαση και μετατροπή οργανικής ύλης σε γόνιμα χώμιττα με πολλά είδη που συνεισφέρουν σε διάφορες πτυχές των εδαφών. Τυχόν μακροπρόθεσμη παρέμβαση σε αυτές τις βιοχημικές σιεργασίες μπορει να έχει ενδεχομένως επγσραση στον κύκλο των θρεπτικών αλάτων και να αλλοιωθεί η γονιμότητα του εδάφους. Σε όλα τα γόνιμα εδάφη επέρχεται μετατροπή του αζώτου και του άνθρακα. Αν και οι μικροβιακές κοινότητες που είναι υπεύθυνες για τις διεργασίες αυτές διαφέρουν απο έδαφος οε έδαφος, οι οδοί μετατροπής ειναι ουσιαστικώς οι ίδιες.

Η περιγραφόμενη παρούας στη διεργασία μετατροπής του αζώτου σε αερόβια επιφανειακά εδάφη. Η μέφοδος δοκιμής επιτρέπει επίσης την εκτίμήση των επιδράσεων ουσιών στη μετατροπή του άνθρακα από τη μικροχλωρίδα του εδάφους. Ο σχηματιουός νιτρικών γίνεται μετά την αποικοδόμηση των δεσμών άνθρακααζώτου. Συνεπώς, εάν βρεθούν τα ίδια ποσοστά παραγωγής αποικοδόμησης του άνθρακα να είναι άθικτες και λειτουργικές. Το επιλεγμένο για τη δοκιμή μεταξύ 12/1 και 16/1). Λόγω τούτου, μειώνεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής η στέρηση άνθρακα και εάν μικροβιακές κοινότητες καταστραφούν από κάποιο χημικό, αυτές μτορεί να ανανήψουν μέσα οε 100 ημέρες.

▼B

Οι δοκιμές από τις οποίες αναπτύχθηκε η παρούσα μέθοδος δοκιμής είχαν αρχικά σχεδιαστεί για ουσίες για τις οποίες μροβλεφθεί η ποσότητα που φθάνει οτο έδαφος. Αυτό ιοχύει, π.χ., στην περίπτωση προϊόντων προστασίας καλλιεργειών για τα οποία ειναι γνωστό το ποσοστό χρήσης στα εδάφη. Για τα αγροχημικά, αρκεί η δοκιμή δύο δόσεων σχετικών με το προαναμενόμενο ή προβλεπόμενο ποσοστό χρήσης. Τα αγροχημικά μπορούν να δοκιμαστούν ως σραστικά συστατικά (δ.σ.) ή ως τυποτοιημένης συνθέσεως προϊόντα. Ωστόσο, η σοκιμή δεν περιορίζεται στα αγροχημικά. Αλλάξοντας τόσο τις ποσότητες της εφαρμοζόμενης στο έσαφος υπό δοκιμή ουσίας, όσο και τον τρόπο με τον οποίο αξιαλογούνται τα δεδομένα, η δοκιμή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για χημικά για τα οποία δεν είναι γνωστή η αναμενόμενη να φθάσει στο έδαφος ποσότητα. Ετσι, στην περιπτωση χημικών του δεν εμπίπτουν στην κατηγορία των αγροχημικών, προσδιορίζονται οι επιδράσεις μιας σειράς συγκεντρώσεων στην μετατροπή τυ αζώτου. Τα στοιχεία από τις δοκιμές αυτές χρησιμοποιούνται για τη χάραξη καμπύλης δόσεχως-απόκρισης και τον υπολογισμό τιμών EC_{21} άπου το χ ορίζεται ως η % επιδραση.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Μετατροπή αζώτου: είναι η τελική αποικοδόμηση από μικροοργανισμούς οργανικής ύλης που περιέχει άζωτο, μέσω των διεργασιών της αμμωνιοποίησης και νιτροποίησης, στο αντίστοιχο ανόργανο τελικό νιτρικό προϊόν.

EC_X (συγκέντρωση αποτελέσματος χ): είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, η οποία απολήγει σε χ % αναστολή της μετατροπής του αζώτου σε νιτρικά.

EC_{50} (συγκέντρωση διάμεσου αποτελέσματος): είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, η οποία απολήγει σε 50 % αναστολή της μετατροπής του αζώτου σε νιτρικά.

1.3 ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμμία

1.4 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Κοσκινισμένο χώμα τροποποιείται με την προσθήκη κονιοποιημένου αλεύρου μηδικής και στη συνέχεια είτε υποβάλλεται σε κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία, είτε αφήνεται ακατέργαστο (μάρτυρας). Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, συνιστώνται κατ' ελάχιστο δύο συγκεντρώσεις για δοκιμή επιλεγόμενες μεταξύ των υψηλότερων αναμενόμενων επιτόπιων συγκεντρώσεων. Μετά 0, 7, 14 ημέρες και 28 ημέρες επώασης, εκχυλίζονται με κατάλληλο διαλύτη δείγματα κατεργασμένων και μη κατεργασμένων εδαφών και προσδιορίζονται οι ποσότητες των νιτρικών στα εκχυλίσματα. Το ποσοστό σχηματισμού νιτρικών στα κατεργασμένα δείγματα συγκρίνεται με το ποσοστό στα δείγματα-μάρτυρες και υπολογίζεται η % απόκλιση των κατεργασμένων από τα μη κατεργασμένα (μάρτυρες). Όλες οι δοκιμές διαρκούν τουλάχιστον 28 ημέρες. Εάν, την 28η ημέρα, οι διαφορές μεταξύ κατεργασμένων και μη κατεργασμένων εδαφών είναι ίσες ή μεγαλύτερες του 25 %, οι μετρήσεις συνεχίζονται μέχρι 100 ημέρες το πολύ. Εάν δεν δοκιμάζονται αγροχημικά, στα δείγματα του εδάφους προστίθεται μια σειρά συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας και μετά 28 ημέρες επώασης μετρώνται οι ποσότητες των νιτρικών που σχηματίζονται στα κατεργασμένα δείγματα και στα δείγματα μάρτυρες. Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές με τις πολλαπλές συγκεντρώσεις αναλύονται χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο αναγωγής και υπολογίζονται οι τιμές EQ_X (δη. EC_{50}, EC_{25} και/ή EC_{10}). Βλ. ορισμούς.

1.5 ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Οι αξιολογήσεις των αποτελεσμάτων των δοκιμών με αγροχημικά βασίζονται σε σχετικώς μικρές διαφορές (δηλ. μέση τιμή ± 25 %) μεταξύ των συγκεντρώσεων νιτρικών σε δείγματα κατεργασμένων εδαφών και εδαφών μαρτύρων, έτσι τυχόν μεγάλες διακυμάνσεις στους μάρτυρες μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Συνεπώς, η διακύμανση μεταξύ επαναληπτικών δειγμάτων μαρτύρων θα πρέπει να είναι μικρότερη του ± 15 %.

▼B

1.6 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1 **Εξοπλισμός**

Χρησιμοποιούνται δοχεία δοκιμής κατασκευασμένα από χημικώς αδρανές υλικό. Τα δοχεία θα πρέπει να είναι κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία για την επώαση των εδαφών, δηλ. επώαση σε χύδην κατάσταση ή ως σειρά επιμέρους δειγμάτων εδάφους (βλ. ενότητα 1.7.1.2). Θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια τόσο για την ελαχιστοποίηση της απώλειας νερού όσο και για την παροχή δυνατότητας ανταλλαγής αερίων (π.χ. τα δοχεία δοκιμής μπορούν να καλύπτονται με διάτρητο φύλλο πολυαιθυλενίου). Όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σφραγιζόμενα και αεροστεγή δοχεία. Τα δοχεία θα πρέπει να είναι κατάλληλου μεγέθους ώστε με το εδαφικό δείγμα να πληρούται το ένα τέταρτο περίπου του όγκου τους.

Χρησιμοποιείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, συμπεριλαμβανομένων των ακολούθων:

— διάταξη αναδεύσεως: μηχανικός αναδευτήρας ή παρόμοιος εξοπλισμός

— φυγόκεντρος (3 000 g) ή διάταξη διηθήσεως (με χρήση χάρτινου ηθμού απηλλαγμένου νιτρικών)

— όργανο κατάλληλης ευαισθησίας και αναπαραγωγιμότητας για ανάλυση νιτρικών.

1.6.2 **Επιλογή και αριθμός εδαφών**

Χρησιμοποιείται ένα μοναδικό έδαφος. Τα συνιστώμενα εδαφικά χαρακτηριστικά είναι τα εξής:

— περιεκτικότητα σε άμμο: τουλάχιστον 50 % μέχρι το πολύ 75 %

— pH: 5,5-7,5;

— περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα: 0,5-1,5 %;

— θα πρέπει να μετριέται η μικροβιακή βιομάζα (8)(9) και η περιεκτικότητα της σε άνθρακα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 % του συνόλου του οργανικού άνθρακα του εδάφους.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, έδαφος με τα χαρακτηριστικά αυτά αντιπροσωπεύει τη χειρότερη περίπτωση, αφού η προσρόφηση του υπό δοκιμή χημικού είναι ελάχιστη και η διαθεσιμότητά του στη μικροχλωρίδα μέγιστη. Συνεπώς, δεν χρειάζονται εν γένει δοκιμές με άλλα εδάφη. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν η προβλεπόμενη κύρια χρήση της υπό δοκιμή ουσίας είναι για συγκεκριμένα εδάφη, όπως όξινα εδάφη δασών, ή στην περίπτωση ηλεκτροστατικώς φορτισμένων χημικών, μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί και κάποιο άλλο ακόμη έδαφος.

▼B

1.6.3 **Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων εδαφών**

1.6.3.1 *Συλλογή*

Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες λεπτομερείς πληροφορίες για το ιστορικό του συγκεκριμένου τόπου από τον οποίο συλλέγεται το προς δοκιμή δείγμα. Στα στοιχεία πρέπει να περιλαμβάνονται η ακριβής τοποθεσία, η υπάρχουσα βλάστηση, οι ημερομηνίες κατεργασίας με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, κατεργασίες με οργανικά και ανόργανα λιπάσματα, προσθήκες βιολογικών υλικών ή τυχαίες επιμολύνσεις. Ο επιλεγμένος τόπος για τη συλλογή εδάφους θα πρέπει να επιτρέπει τη μακροπρόθεσμη χρήση. Κατάλληλοι προς τούτο είναι μόνιμα βοσκοτόπια, αγροί με ετήσιες καλλιέργειες δημητριακών (εκτός αραβοσίτου) ή πυκνοσπαρμένοι με χλωρό λίπασμα. Ο επιλεγμένος τόπος δειγματοληψίας δεν θα πρέπει να έχει υποβληθεί σε κατεργασία με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών για ένα τουλάχιστον χρόνο πριν από τη δειγματοληψία. Επίσης, για έξι μήνες τουλάχιστον δεν θα πρέπει να έχει χρησιμοποιηθεί οργανικό λίπασμα. Η χρήση ανόργανου λιπάσματος είναι αποδεκτή μόνον όταν είναι σύμφωνη με τις απαιτήσεις της καλλιέργειας και δεν θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα εδάφους παρά μόνον τρεις μήνες τουλάχιστον μετά από τη χρήση του λιπάσματος. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση εδάφους κατεργασμένου με λιπάσματα με γνωστές βιοκτόνες επιδράσεις (π.χ. κυαναμίδιο ασβεστίου).

Θα πρέπει να αποφεύγεται δειγματοληψία κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά μακρές περιόδους (μεγαλύτερες των 30 ημερών) ξηρασίας ή κατάκλυσης με νερό. Για οργωμένα εδάφη, τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται από βάθος 0 έως 20 cm. Για χορτολιβαδικές εκτάσεις (βοσκές) ή άλλα εδάφη τα οποία δεν οργώνονται για μακρύτερες περιόδους (τουλάχιστον μία καλλιεργητική περίοδος), το μέγιστο βάθος δειγματοληψίας μπορεί να είναι ελαφρώς μεγαλύτερο από 20 cm (π.χ. έως 25 cm).

Τα δείγματα εδάφους θα πρέπει να μεταφέρονται χρησιμοποιώντας δοχεία και υποθερμοκρασιακές συνθήκες που να εγγυώνται ότι δεν υπάρχει περίπτωση σημαντικής μεταβολής των αρχικών ιδιοτήτων του εδάφους.

1.6.3.2 *Αποθήκευση*

Προτιμάται η χρήση εδαφών προσφάτως συλλεγέντων από την τοποθεσία συλλογής: Εάν δεν μπορεί να αποφευχθεί η αποθήκευση στο εργαστήριο, τα εδάφη μπορούν να αποθηκεύονται στο σκοτάδι στους 4±2 °C για τρεις μήνες κατ' ανώτατο όριο. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των εδαφών, πρέπει να διασφαλίζεται η ύπαρξη αερόβιων συνθηκών. Εάν τα εδάφη συλλέγονται από περιοχές όπου είναι κατεψυγμένα για τρεις μήνες τουλάχιστον το χρόνο, μπορεί να εξεταστεί και η αποθήκευση για έξι μηνες στους - 18 °C έως - 22 °C. Πριν από κάθε πείραμα μετριέται η μικροβιακή βιομάζα των αποθηκευμένων εδαφών, ο άνθρακας δε στη βιομάζα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 % του συνολικώς περιεχομένου στο έδαφος οργανικού άνθρακα (βλ. ενότητα 1.6.2).

1.6.4 **Χειρισμός και προετοιμασία των εδαφών για τη δοκιμή**

1.6.4.1 *Προεπώαση*

Εφόσον το έδαφος αποθηκεύτηκε (βλ. ενότητα 1.6.3.2), συνιστάται προεπώαση για μια περίοδο μεταξύ 2 και 28 ημερών. Η θερμοκρασία και υγρασία του εδάφους κατά τη διάρκεια της προεπώασης θα πρέπει να είναι παρόμοιες με τις χρησιμοποιούμενες στη δοκιμή (βλ. ενότητες 1.6.4.2 και 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Φυσικοχημικά χαρακτηριστικό.*

Το έδαφος καθαρίζεται με το χέρι από τυχόν ενυπάρχοντα μεγάλα αντικείμενα (π.χ. πέτρες, μέρη φυτών, κλπ) και κατόπιν κοσκινίζεται εν υγρώ χωρίς υπερβολική ξήρανση για λήψη σωματιδίων μεγέθους μέχρι το πολύ 2 mm. Η υγρασία του δείγματος εδάφους θα πρέπει να ρυθμίζεται με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό σε τιμή μεταξύ 40 και 60 % της μέγιστης ικανότητας για συγκράτηση νερού.

1.6.4.3 *Τροποποίηση με οργανικό υπόστρωμα*

Το έδαφος θα πρέπει να τροποποιείται με κατάλληλο οργανικό υπόστρωμα, π.χ. κονιοποιημένο άλευρο πράσινης μηδικής (κύριο συστατικό: *Medicago sativa)* με λόγο C/N μεταξύ 12/1 και 16/1. Ο συνιστώμενος λόγος μηδικής-εδάφους είναι 5 g μηδικής ανά χιλιόγραμμο εδάφους (ξηρά μάζα).

1.6.5 **Προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας για εφαρμογή στο έδαφος**

Η υπό δοκιμή ουσία εφαρμόζεται κυρίως χρησιμοποιώντας κάποιον φορέα. Ο φορέας μπορεί να είναι νερό (για υδατοδιαλυτές ουσίες) ή αδρανές στερεό όπως λεπτή χαλαζιακή άμμος (μέγεθος σωματιδίων: 0,1-0,5 mm). Αλλοι υγροί φορείς (π.χ. οργανικοί διαλύτες όπως ακετόνη, χλωροφόρμιο) εκτός νερού θα πρέπει να αποφεύγονται επειδή μπορεί να καταστρέψουν τη μικροχλωρίδα. Εφόσον ως φορέας χρησιμοποιείται άμμος, αυτή μπορεί να επιχρίεται με την υπό δοκιμή ουσία διαλελυμένη ή εναιωρούμενη σε κατάλληλο διαλύτη. Στις περιπτώσεις αυτές, ο διαλύτης θα πρέπει να απομακρύνεται με εξάτμιση πριν από την ανάμειξη με το έδαφος. Για άριστη κατανομή της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, συνιστάται μια σχέση 10 g άμμου ανά χιλιόγραμμο εδάφους (ξηρά μάζα). Τα δείγματα-μάρτυρες υποβάλλονται σε κατεργασία με ισοδύναμη ποσότητα νερού και/ή χαλαζιακής άμμου μόνον.

Όταν δοκιμάζονται πτητικά χημικά, θα πρέπει να αποφεύγονται κατά το δυνατόν απώλειες κατά την κατεργασία και να γίνεται προσπάθεια για τη διασφάλιση ομοιογενούς κατανομής στο έδαφος (π.χ. η υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει να εγχύεται στο έδαφος σε διάφορα σημεία).

1.6.6 **Συγκεντρώσεις δοκιμής**

Όταν δοκιμάζονται αγροχημικά, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις. Η μικρότερη συγκέντρωση θα πρέπει να αντιπροσωπεύει τουλάχιστον τη μέγιστη ποσότητα που αναμένεται να φθάσει στο έδαφος υπό συνθήκες συναντώμενες στην πράξη ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση θα πρέπει να είναι πολλαπλάσια της μικρότερης συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις της προστιθέμενης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας υπολογίζονται υποθέτοντας ομοιόμορφη ενσωμάτωση μέχρι βάθους 5 cm και φαινόμενη πυκνότητα εδάφους 1,5. Για αγροχημικά που εφαρμόζονται απευθείας στο έδαφος, ή για χημικά για τα οποία μπορεί να προβλεφθεί η ποσότητα που φθάνει στό έδαφος, οι συνιστώμενες συγκεντρώσεις δοκιμής είναι η μέγιστη Προβλεπόμενη Περιβαλλοντική Συγκέντρωση (ΠΠΣ) και το πενταπλάσιο αυτής της συγκέντρωσης. Ουσίες που αναμένεται να εφαρμοστούν σε εδάφη αρκετές φορές σε μια καλλιεργητική περίοδο θα πρέπει να δοκιμάζονται σε συγκεντρώσεις προκύπτουσες από τον πολλαπλασιασμό της ΠΠΣ επί το μέγιστο αναμενόμενο αριθμό εφαρμογών. Η μεγαλύτερη, ωστόσο, συγκέντρωση δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το δεκαπλάσιο του μέγιστου εφάπαξ ποσοστού εφαρμογής. Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, χρησιμοποιείται γεωμετρική σειρά πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να καλύπτουν το εύρος που απαιτείται για τον προσδιορισμό των τιμών EC_X.

▼B

1.7 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.7.1 **Συνθήκες έκθεσης**

1.7.1.1 *Κατεργασία και έλεγχος*

Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, το εδαφικό δείγμα διαιρείται σε τρία τμήματα ίσου βάρους. Δύο τμήματα αναμειγνύονται με το φορέα που περιέχει το προϊόν, ενώ το άλλο αναμειγνύεται με το φορέα χωρίς το προϊόν (μάρτυρας). Τόσο για τα κατεργασμένα όσο και για τα ακατέργαστα εδάφη συνιστάται η παρασκευή τουλάχιστον τριών επαναληπτικών δειγμάτων. Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, το εδαφικό δείγμα χωρίζεται σε έξι τμήματα ίσου βάρους. Πέντε από τα δείγματα αναμειγνύονται με τον φορέα που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία, ενώ το έκτο δείγμα αναμειγνύεται με τον φορέα χωρίς το χημικό. Τόσο για τα κατεργασμένα, όσο και για τους μάρτυρες, συνιστάται η παρασκευή τριών επαναληπτικών δειγμάτων. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή ώστε να διασφαλίζεται η ομοιογενής κατανομή της υπό δοκιμή ουσίας στα κατεργασμένα εδαφικά δείγματα. Κατά τη διάρκεια της ανάμειξης, θα πρέπει να αποφεύγεται το έδαφος να λαμβάνει συμπαγή μορφή ή μορφή σβώλων.

1.7.1.2 *Επώαση των εδαφικών δειγμάτων*

Η επώαση των εδαφικών δειγμάτων μπορεί να γίνεται με δύο τρόπους: ως χύδην δείγματα κάθε κατεργασμένου και μη κατεργασμένου εδάφους ή ως σειρά επιμέρους και ταυτόσημου μεγέθους μερικών δειγμάτων κάθε κατεργασμένου και μη κατεργασμένου εδάφους. Ωστόσο, όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, η δοκιμή θα πρέπει να γίνεται μόνον μια μια σειρά επιμέρους μερικών δειγμάτων. Όταν τα εδάφη επωάζονται χύδην, προετοιμάζονται μεγάλες ποσότητες κάθε κατεργασμένου και μη εδάφους και τα προς ανάλυση μερικά δείγματα λαμβάνονται όπως απαιτείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Η αρχικώς προετοιμαζόμενη ποσότητα για κάθε κατεργασία και μαρτυρία εξαρτάται από το μέγεθος των μερικών δειγμάτων, τον αριθμό των επαναληπτικών δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για ανάλυση και τον αναμενόμενο μέγιστο αριθμό χρόνων δειγματοληψίας. Τα χύδην επωαζόμενα εδάφη θα πρέπει να αναμειγνύονται επισταμένως πριν από τη λήψη των μερικών δειγμάτων. Όταν τα εδάφη επωάζονται ως σειρά επιμέρους εδαφικών δειγμάτων, κάθε χύδην κατεργασμένο και μη έδαφος διαιρείται στον απαιτούμενο αριθμό μερικών δειγμάτων και τα τελευταία χρησιμοποιούνται όπως απαιτείται. Σε δοκιμές όπου μπορούν να αναμένονται περισσότεροι των δύο χρόνοι δειγματοληψίας, θα πρέπει να παρασκευάζεται ικανός αριθμός μερικών δειγμάτων ώστε να καλύπτονται, από πλευράς αριθμού, το σύνολο των επαναληπτικών δειγμάτων και των χρόνων δειγματοληψίας. Θα πρέπει να επωάζονται τουλάχιστον τρία επαναληπτικά δείγματα του υπό δοκιμή εδάφους υπό αερόβιες συνθήκες (βλ. ενότητα 1.7.1.1). Κατά τη διάρκεια όλων των δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δοχεία με επαρκή κενό χώρο άνωθεν για να αποφεύγεται η ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών. Όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται μόνον με μια σειρά επιμέρους μερικών δηγμάτων.

1.7.1.3 *Συνθήκες και διάρκεια δοκιμής*

Η δοκιμή εκτελείται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου 20±2 ºC. Η υγρασία των εδαφικών δειγμάτων θα πρέπει να διατηρείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης ικανότητας συγκράτησης νερού του εδάφους (βλ. ενότητα 1.6.4.2) με διακύμανση ±5 %. Εφόσον χρειάζεται, μπορεί να προστεθεί απεσταγμένο, απιονισμένο νερό.

Η ελάχιστη διάρκεια των δοκιμών είναι 28 ημέρες. Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, συγκρίνονται τα ποσοστά σχηματισμού νιτρικών σε κατεργασμένα και σε δείγματα μάρτυρες. Εάν την 28η ημέρα διαφέρουν κατά ποσοστό άνω του 25 %, η δοκιμή συνεχίζεται μέχρις ότου ληφθεί διαφορά ίση ή μικρότερη του 25 %, ή για μέγιστο χρονικό διάστημα 100 ημερών, ανάλογα με το ποιο επιτυγχάνεται συντομότερα. Για μη αγροχημικά, η δοκιμή τερματίζεται μετά 28 ημέρες. Την 28η ημέρα, προσδιορίζονται οι ποσότητες των νιτρικών στα κατεργασμένα και στα δείγματα μάρτυρες και υπολογίζονται οι τιμές EC_X.

▼B

1.7.2 **Δειγματοληψία και ανάλυση εδαφών**

1.7.2.1 *Χρονογιάγραμμα δειγματοληψίας εδαφών*

Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, τα εδαφικά δείγματα αναλύονται για νιτρικά κατά τις ημέρες 0, 7, 14 και 28.

Εάν απαιτείται παρατεταμένη δοκιμή, θα πρέπει να γίνονται περαιτέρω μετρήσεις σε διαστήματα 14 ημερών μετά την 28η ημέρα. Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής και τα εδαφικά δείγματα αναλύονται για χημικά στην αρχή (ημέρα 0) και στο τέλος της περιόδου έκθεσης (28 ημέρες). Εφόσον κριθεί αναγκαίο, μπορεί να προστεθεί και μια ενδιάμεση μέτρηση, π.χ. την 7η ημέρα. Τα δεδομένα της 28ης ημέρας χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της τιμής EC_X του χημικού. Εφόσον είναι επιθυμητό, για την αναφορά της αρχικής ποσότητας νιτρικών στο έδαφος μπορούν να χρησιμοποιηθούν δεδομένα από τα δείγματα-μάρτυρες της ημέρας 0.

1.7.2.2 *Ανάλνοη εδαφικών δειγμάτων*

Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας προσδιορίζεται η ποσότητα των νιτρικών που σχηματίζονται σε κάθε επαναληπτικό κατεργασμένο δείγμα και δείγμα-μάρτυρα. Τα νιτρικά εκχυλίζονται από το έδαφος αναδεύοντας δείγματα με κατάλληλο διαλύτη εκχύλισης, π.χ. διάλυμα χλωριούχου καλίου 0,1 M. Συνιστάται μια σχέση 5 ml διαλύματος KC1 ανά γραμμάριο ξηρού βάρους ισοδύναμου εδάφους. Για βελτιστοποίηση της εκχύλισης, τα δοχεία με το έδαφος και το διάλυμα εκχύλισης δεν θα πρέπει να είναι γεμάτα πάνω από το μισό. Τα μίγματα αναδεύονται με 150 σ.α.λ για 60 λεπτά Τα μίγματα φυγοκεντρούνται ή διηθούνται και οι υγρές φάσεις αναλύονται για νιτρικά Υγρά εκχυλίσματα απηλλαγμένα σωματιδίων μπορούν να αποθηκευτούν πριν από την ανάλυση σε θερμοκρασία - 20±5 ºC για μέχρι έξι μήνες.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Εάν διεξάγονται δοκιμές με αγροχημικά, θα πρέπει να καταγράφεται η ποσότητα των νιτρικών που σχηματίζονται σε κάθε επαναληπτικό δείγμα εδάφους και να καταγράφονται σε πίνακα οι μέσες τιμές όλων των επαναληπτικών δειγμάτων. Τα ποσοστά μετατροπής του αζώτου θα πρέπει να εκτιμώνται με κατάλληλες και εν γένει αποδεκτές στατιστικές μεθόδους (π.χ. F-δοκιμή, 5 % επίπεδο σημαντικότητας). Οι ποσότητες των σχηματιζομένων νιτρικών εκφράζονται σε mg νιτρικών/kg ξηρού βάρους εδάφους/ημέρα. Το ποσοστό μετατροπής νιτρικών σε κάθε κατεργασία συγκρίνεται με εκείνο του μάρτυρα και υπολογίζεται η % απόκλιση από τον μάρτυρα.

Εάν πραγματοποιούνται δοκιμές με μη αγροχημικά, προσδιορίζεται η ποσότητα των νιτρικών σε κάθε επαναληπτικό δείγμα και χαράσσεται καμπύλη δόσης-απόκρισης για υπολογισμό των τιμών EC_X. Οι ανευρισκόμενες ποσότητες νιτρικών (δηλ. mg νιτρικών/kg ξηρού βάρους εδάφους) στα κατεργασμένα δείγματα μετά 28 ημέρες συγκρίνονται με τις ανευρισκόμενες στο μάρτυρα. Από τα στοιχεία αυτά, υπολογίζονται οι % τιμές αναστολής για κάθε συγκέντρωση δοκιμής. Τα % ποσοστά αυτά καταγράφονται γραφικώς συναρτήσει της συγκεντρώσεως και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται στατιστικές διαδικασίες για τον υπολογισμό των τιμών EC_X. Προσδιορίζονται επίσης όρια εμπιστοσύνης (ρ = 0,95) για τις υπολογιζόμενες τιμές EC_X χρησιμοποιώντας τυποποιημένες διαδικασίες (10)(11)(12).

Οι υπό δοκιμή ουσίες που περιέχουν υψηλές ποσότητες αζώτου μπορεί να συνεισφέρουν στις ποσότητες νιτρικών που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Εάν οι ουσίες αυτές δοκιμάζονται σε υψηλή συγκέντρωση (π.χ. χημικά που αναμένεται να χρησιμοποιηθούν επανειλημμένως), στη δοκιμή πρέπει να περιλαμβάνονται κατάλληλοι μάρτυρες (δηλ. έδαφος με υπό δοκιμή ουσία αλλά χωρίς φυτάλευρο). Στους υπολογισμούς EC_X πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα δεδομένα από τους ελέγχους αυτούς.

▼B

2.2 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όταν υπολογίζονται αποτελέσματα από δοκιμές με αγροχημικά και η διαφορά στα ποσοστά σχηματισμού νιτρικών μεταξύ της με χαμηλότερο ποσοστό κατεργασίας (δηλ. της μέγιστης προβλεπόμενης συγκέντρωσης) και μάρτυρα είναι ίση ή μικρότερη του 25 % σε οποιοδήποτε χρόνο δειγματοληψίας μετά την 28η ημέρα, το προϊόν μπορεί να αξιολογηθεί ως μη έχον μακροπρόθεσμη επίδραση στη μετατροπή του αζώτου στα εδάφη. 'Οταν αξιολογούνται αποτελέσματα από δοκιμές με χημικά άλλα εκτός των αγροχημικών, χρησιμοποιούνται οι τιμές EC50, EC_{25} και/ή EC_{10}.

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Πλήρη ταυτοποίηση του χρησιμοποιηθέντος εδάφους, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

— γεωγραφικό στίγμα του τόπου (γεωγραφικό πλάτος και μήκος)

— πληροφορίες για το ιστορικό του τόπου (δηλ. κάλυψη από βλάστηση, κατεργασίες με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, κατεργασίες με λιπάσματα, τυχαία επιμόλυνση, κλπ)

— πρότυπο χρήσης (π.χ. γεωργικό έδαφος, δάσος, κλπ.)

— βάθος δειγματοληψίας (cm);

— περιεκτικότητα σε άμμο/ιλύ/άργιλο (% επί ξηρού βάρους)

— pH (στο νερό)

— περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (% επί ξηρού βάρους)

— περιεκτικότητα σε άζωτο (% επί ξηρού βάρους)

— αρχική συγκέντρωση νιτρικών (mg νιτρικών/kg ξηρής μάζας)

— κατιοανταλλακτική ικανότητα (mmol/kg)

— μικροβιακή βιομάζα ως ποσοστό του συνολικού οργανικού άνθρακα

— αναφορά των χρησιμοποιηθεισών μεθόδων για τον προσδιορισμό κάθε παραμέτρου

— κάθε πληροφορία σχετικά με τη συλλογή και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων

— λεπτομέρειες για την προεπώαση του εδάφους, εφόσον συντρέχει περίπτωση. Υπό δοκιμή ουσία:

φυσική υπόσταση της ουσίας και, όπου χρειάζεται, φυσικοχημικές ιδιότητες

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης, όπου χρειάζεται, συμπεριλαμβανομένου του χημικού τύπου, της καθαρότητας (δηλ. για προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, το ποσοστό του δραστικού συστατικού), περιεκτικότητα σε άζωτο.

— Υπόστρωμα:

πηγή υποστρώματος,

— σύνθεση (δηλ. άλευρο μηδικής, άλευρο πράσινης μηδικής),

— περιεκτικότητα σε άνθρακα, άζωτο (% επί ξηρού βάρους),

— μέγεθος κοσκινού (mm).

▼B

— Συνθήκες δοκιμής:

λεπτομέρειες της τροποποίησης του εδάφους με οργανικό υπόστρωμα,

— αριθμός χρησιμοποιηθεισών συγκεντρώσεων του υπό δοκιμή χημικού και, όπου κρίνεται σκόπιμο, αιτιολόγηση των επιλεγεισών συγκεντρώσεων,

— λεπτομέρειες για την εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος,

— θερμοκρασία επώασης,

— υγρασία εδάφους στη αρχή και κατά τη διάρκεια της δοκιμής,

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος επώασης εδάφους (δηλ. χύδην ή ως σειρά επιμέρους μερικών δειγμάτων),

— αριθμός επαναληπτικών δειγμάτων,

— χρόνοι δειγματοληψίας,

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος για εκχύλιση των νιτρικών από το έδαφος

— Αποτελέσματα:

χρησιμοποιηθείσα αναλυτική διαδικασία και εξοπλισμός για ανάλυση των νιτρικών,

— δεδομένα σε μορφή πίνακα, συμπεριλαμβανομένων μεμονωμένων και μέσων τιμών για μετρήσεις νιτρικών,

— διακύμανση μεταξύ των επαναληπτικών δειγμάτων σε κατεργασμένα δείγματα και σε δείγματα μάρτυρες,

— εξηγήσεις διορθώσεων που έγιναν στους υπολογισμούς, εφόσον συντρέχει περίπτωση,

— η % διακύμανση στα ποσοστά σχηματισμού νιτρικών σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ή,

— εάν κρίνεται σκόπιμο, η τιμή EC_{50} με 95 % όριο εμπιστοσύνης, άλλες τιμές EC_X (π.χ. EC_{25} ή EC_{10}) με διαστήματα εμπιστοσύνης και ένα γράφημα της καμπύλης δόσης-απόκρισης,

— στατιστική κατεργασία αποτελεσμάτων,

— κάθε πληροφορία και παρατήρηση χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality -Biological Methods*.

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Γ.22. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΕΔΑΦΟΥΣ: ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής αποτλει αναπαραγωγή της OECD TG 217 (1999).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής περιγράφει εργαστηριακή μέθοδο προοριζόμενη για τη διερεύνηση των μακροπρόθεσμων δυνητικών επιδράσεων που έχει η εφάπας έκθεση προδόντων προστασιας καλλιεπγειάγν και πιθανόν και άλλων χημικών στην ικανότητα μικροοργανισμών του εδάφους να μετατρέπουν τον άνθρακα. Η δοκιμή αυτή βασίξεται κυριως στις συστάσεις του Ευρωπαικού και Μεσογειακού Οργανισμού Φυτοπροστασίας (1). Ωστόσο, ελήφθησαν υπόψη και άλλες κατευθυντήριες οδηγίες, συμτεριλαμβανομένων και εκείνων των German Biologische Bundesanstalt (2), του Οργανισμού Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (3), και της SETAC (4). Σε συνάντηση εργασιας του ΟΟΣΑ για την εκιλογή εδαφών/ιζημάτων, που έγινε στο Belgirate, Ιταλια, το 1995 (5) συμφωνήθηκε ο αριθμός και ο τύπος των προς χρήση εδαφών στην καρούσα δοκιμή. Οι συστάσεις για τη συλλογή, χειρισμό και αποθήκευση των εδαφικών δετγμάτων βασιζονται σε κείμενο οδηγιών του ISO (6) και συστάσεις από τη συνάντηση του Belgirate.

Για την αζισλόγηση και εκτίμηση των τοζικών ξαρακτηριστικών υπό δσκιμή συσιών, μτορεί να ακαιτείται προσδιορισμός των επιδράσεων στη μικροβιακή δραστικότητα του εδάφους, π.χ. όταν απαιτούνται στοιχεία για τις δυνητικές παρενέργειες προτόντων προστασίας καλλιεργειών στη μικροχλωριδα του εδάφους ή όταν αναμένεται έκσεση μικροοργανισμών του εδάφους σε άλλες χημικές συσίες εκτός προτόντων προστασιας καλλιεργειών. Η δοκιμή μετατραπής του άνθρακα πραγματομοκιείται για του μροσδιορισμό των εμιδράσεων των εν λόγω χημικών στη μικροχλωριδα του εδάφους. Εφόσον δοκιμάζονται αγροχημικά (π.χ. προιόντα τροστασίας καλλιεργειών, λιπάσματα, δασοκομικά χημικά), πραγματαποισύνται δοκιμές για τη μετατροπή τόσο του αζώτου όσο και του άνθρακα. Εφόον δεν δοκιμάζονται αγροχημικά, απκει η δοκιμή μετατροπής του αζώτου. Ωστόσο, εάν οι τιμές EC_{50} της δοκιμής μετατροπής του αζώτου για τα εν λόγω χημικά ειναι στην περιοχή των τιμών που βπισκονται για διαθέσιμους στο εμπόριο αναστολεις νιτροποιησης (π.χ. νιτραπυρίνη). μπορεί να διεξαχθεί και δοκιμή μετατροπής του άνθρακα για την απόκτηση περαιτέρω πληροφάπησης.

Τα εδάφη συνίστανται από ζώντα και μη ζώντα συστατικά στοιχεια που υφίστανται σε πολχίπλοκα και ετερογενή μίγματα. Οι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάσπαση και μετατροπή οργανιπής ύλης σε γόνιμα χώματα με πολλά είδη που συνεισφερουν σε διάφορες πτυχές της ψονιμότητας των εδαφών. Τυχόν μακροπρόθεσμη παρέμβαση σε αυτές τις βιοχημικές διεργασιες μπορει να έχει δυνητικώς επιδραση στον κύκλο των θρεπτικών αλάτων και να αλλοιωθει η γονιμότητα του εδάφους. Σε όλα τα γόνιμα εδάφη επέρχεται μετατροπή του αζώτου και του άνθρακα. Αν και οι μικροβιακές κοινότητες που ειναι υπεύθυνες για τις διεργασίες αυτές διαφέρουν ατό έδαφος σε έδαφος, οι οδοι μετατροπής ειναι ουσιαστικώς οι ιδιες.

▼B

Η περιραφόμενη παρούσα μέθοδος δοκιμής προορίζεται για την ανίχνευση μακροπρόθεσμων δυσμενών επιδράσεων μιας ουσίας στη διεργασια μετατροπής του άνθρακα σε αερόβια επιφανειακά εδάφη. Η δοκιμή είναι ευαισθητη σε μεταβολές μεγέθους και δραστικότητας των μικροβιακών κοινοτήτων που ειναι υπεύθυνες για τη μετατροπή του άνθρακα δεδομένου ότι κατά τη δοκιμή οι κοινότητες αυτές υποβάλλονται τόσο σε χημική καταπόνηση όσο και σε στέρηση άνθρακα. Χρησιμοκοισίται αμμιοδες έδαφας χαμηλής περιεκτικότητας σε οργανική ύλη. Το έδαφος αυτό υποβάλλεται σε κατεργασία με την υπό σοκιμή συσία και επωάζεται υπο συνθήκες που επιτρέπουν ταχύ μικροβιακό μεταβολισμό. Υπό τις συνθήκες αυτές, οι πηγές ευκόλως διαθτσιμου άνθπακα στο έδαφος εξαντλούνται με ταχύ ρυθμό. Αυτό προκαλεί έλλειψη άνθρακα με αποτέλεσμα τη θανάτωση των μικροβιακών κυττάρων και την εμφάνιση λανθάνουσας κατάστασης και/ή δημιουργια οπορίων. Εάν η δοκιμή διαρκέσει για πάνα από 28 ημέρες, ο συνδυασμός των αντιδράσεων αυτών μπορεί να μετρηθεί σε (ακατέργαστο έδαφος) μάπτυρες ως προοδευτική απώλεια μεταβολικώς ενεπγού μικροβιακής βιομάζας (7). Εάν βιομάζα εδαφών που αντιμετωπίζουν στερηρικά φαινόμενα από πλευράς άνθρακα, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, επηρεαστεί από την παρουσία χημικής συσιας, μπορεί να μην επιστρέψει στα ιδια επιπεδα με εκεινα του μάρτυρα. Έτσι, διαταχές που προκαλούνται από την υπό δακιμή αυσία ανά πάσα ατιγμή κατά την διάρκεια της δοκιμής διαπκούν συχνά μέχρι το τέλοσ της δοκιμής.

Οι δοκιμές από τις οποίες αναπτύχθηκε η παρούσα μέθοδος δοκιμής είχαν αρχικά σχεδιαστεί για ουσίες για τις οποίες μπορεί να προβλεφθεί η ποσότητα που φθάνει στο έδαφος. Αυτό ισχύει, π.χ., στην περίπτωση προϊόντων προστασίας καλλιεργειών για τα οποία είναι γνωστό το ποσοστό χρήσης στα εδάφη. Για τα αγροχημικά, αρκεί . η δοκιμή δύο δόσεων σχετικών με το προαναμενόμενο ή προβλεπόμενο ποσοστό χρήσης. Τα αγροχημικά μπορούν να δοκιμαστούν ως δραστικά συστατικά (δ.σ.) ή ως τυποποιημένης συνθέσεως προϊόντα. Ωστόσο, η δοκιμή δεν περιορίζεται σε χημικά με προβλέψιμες περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις. Αλλάζοντας τόσο τις ποσότητες της εφαρμοζόμενης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας, όσο και τον τρόπο με τον οποίο αξιολογούνται τα δεδομένα, η δοκιμή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για χημικά για τα οποία δεν είναι γνωστή η αναμενόμενη να φθάσει στο έδαφος ποσότητα. Έτσι, στην περίπτωση χημικών που δεν εμπίπτουν στην κατηγορία των αγροχημικών, προσδιορίζονται οι επιδράσεις μιας σειράς συγκεντρώσεων στην μετατροπή του άνθρακα. Τα στοιχεία από τις δοκιμές αυτές χρησιμοποιούνται για τη χάραξη καμπύλης δόσεως-απόκρισης και τον υπολογισμό τιμών EC_X, όπου το x ορίζεται ως η % επίδραση.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Μετατροπή άνθρακα: είναι η αποικοδόμηση από μικροοργανισμούς οργανικής ύλης για το σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα ως τελικού ανόργανου προϊόντος.

EC_x (συγκέντρωση αποτελέσματος x): είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, η οποία απολήγει σε x % αναστολή της μετατροπής του άνθρακα σε διοξείδιο του άνθρακα.

EC_{50} (συγκέντρωση διάμεσου αποτελέσματος): είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, η οποία απολήγει σε 50 % αναστολή της μετατροπής άνθρακα σε διοξείδιο του άνθρακα.

1.3 ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Καμμία.

▼B

1.4 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Κοσκινισμένο χώμα υποβάλλεται σε κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία ή αφήνεται ακατέργαστο (μάρτυρας). Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, συνιστώνται δύο κατ' ελάχιστο συγκεντρώσεις δοκιμής που θα πρέπει να επιλέγονται ανάλογα με την υψηλότερη αναμενόμενη επιτόπια συγκέντρωση. Μετά 0, 7, 14 και 28 ημέρες επώασης, δείγματα κατεργασμένου και μη κατεργασμένου (μάρτυρας) εδάφους αναμειγνύονται με γλυκόζη και για 12 διαδοχικές ώρες μετρώνται οι επαγόμενοι από τη γλυκόζη ρυθμοί αναπνοής. Οι ρυθμοί αναπνοής εκφράζονται ως απελευθερούμενο διοξείδιο του άνθρακα (mg διοξειδίου του άνθρακα/kg ξηρού εδάφους/h) ή ως καταναλισκόμενο οξυγόνο (mg οξυγόνου/kg εδάφους/h). Ο μέσος ρυθμός αναπνοής στα κατεργασμένα εδαφικά δείγματα συγκρίνεται με εκείνον του μάρτυρα και υπολογίζεται η % απόκλιση του κατεργασμένου από το μάρτυρα. Όλες οι δοκιμές διαρκούν τουλάχιστον 28 ημέρες. Εάν, την 28η ημέρα, οι διαφορές μεταξύ κατεργασμένων και μη κατεργασμένων εδαφών είναι ίσες ή μεγαλύτερες του 25 %, οι μετρήσεις συνεχίζονται σε διαστήματα 14 ημερών μέχρι 100 ημέρες το πολύ. Εάν οι υπό δοκιμή ουσίες δεν ανήκουν στα αγροχημικά, στα δείγματα του εδάφους προστίθεται μια σειρά συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας και μετά 28 ημέρες μετρώνται οι προκαλούμενοι από τη γλυκόζη ρυθμοί αναπνοής (δηλ ο μέσος όρος των σχηματιζομένων ποσοτήτων διοξειδίου του άνθρακα ή των καταναλισκομένων ποσοτήτων οξυγόνου). Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές με τη σειρά συγκεντρώσεων αναλύονται χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο αναγωγής και υπολογίζονται οι τιμές EC_x (δη. EC_{50}, EC_{25} και/ή EC_{10}). Βλ. ορισμούς.

1.5 ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Οι αξιολογήσεις των αποτελεσμάτων των δοκιμών με αγροχημικά βασίζονται σε σχετικώς μικρές διαφορές (δηλ. μέση τιμή ±25 %) μεταξύ του απελευθερούμενου διοξειδίου του άνθρακα ή του καταναλισκόμενου οξυγόνου, στα (ή από) τα κατεργασμένα εδαφικά δείγματα ή δείγματα-μάρτυρες, έτσι τυχόν μεγάλες διακυμάνσεις στους μάρτυρες μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Συνεπώς, η διακύμανση μεταξύ επαναληπτικών δειγμάτων-μαρτύρων θα πρέπει να είναι μικρότερη του ±15 %.

1.6 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1 **Εξοπλισμός**

Χρησιμοποιούνται δοχεία δοκιμής κατασκευασμένα από χημικώς αδρανές υλικό. Τα δοχεία θα πρέπει να είναι κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία για την επώαση των εδαφών, δηλ. επώαση σε χύδην κατάσταση ή ως σειρά επιμέρους δηγμάτων εδάφους (βλ. ενότητα 1.7.1.2). Θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια τόσο για την ελαχιστοποίηση της απώλειας νερού όσο και για την παροχή δυνατότητας ανταλλαγής αερίων (π.χ. τα δοχεία δοκιμής μπορούν να καλύπτονται με διάτρητο φύλλο πολυαιθυλενίου). Όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σφραγιζόμενα και αεροστεγή δοχεία. Τα δοχεία θα πρέπει να είναι κατάλληλου μεγέθους ώστε με το εδαφικό δείγμα να πληρούται το ένα τέταρτο περίπου του όγκου τους.

Για τον προσδιορισμό της προκαλούμενης από τη γλυκόζη αναπνοής, απαιτούνται συστήματα επωάσεων και όργανα για τη μέτρηση της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα ή κατανάλωσης οξυγόνου. Παραδείγματα τέτοιων συστημάτων και οργάνων ανευρίσκονται στη βιβλιογραφία (8) (9) (10) (11).

1.6.2 **Επιλογή και αριθμός εδαφών**

Χρησιμοποιείται ένα μοναδικό έδαφος. Τα συνιστώμενα εδαφικά χαρακτηριστικά είναι τα εξής:

— περιεκτικότητα σε άμμο: τουλάχιστον 50 % μέχρι το πολύ 75 %

▼B

— ρH: 5,5-7,5;

— περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα: 0,5-1,5 %;

— θα πρέπει να μετριέται η μικροβιακή βιομάζα (12)(13) και η περιεκτικότητά της σε άνθρακα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 % του συνόλου του οργανικού άνθρακα του εδάφους.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, έδαφος με τα χαρακτηριστικά αυτά αντιπροσωπεύει τη χειρότερη περίπτωση, αφού η προσρόφηση του υπό δοκιμή χημικού είναι ελάχιστη και η διαθεσιμότητά του στη μικροχλωρίδα μέγιστη. Συνεπώς, δεν χρειάζονται εν γένει δοκιμές με άλλα εδάφη. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν η προβλεπόμενη κύρια χρήση της υπό δοκιμή ουσίας είναι για συγκεκριμένα εδάφη, όπως όξινα εδάφη δασών, ή στην περίπτωση ηλεκτροστατικώς φορτισμένων χημικών, μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί και κάποιο άλλο ακόμη έδαφος.

1.6.3 **Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων εδαφών**

1.6.3.1 *Συλλογή*

Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες λεπτομερείς πληροφορίες για το ιστορικό του συγκεκριμένου τόπου από τον οποίο συλλέγεται το προς δοκιμή δείγμα. Στα στοιχεία πρέπει να περιλαμβάνονται η ακριβής τοποθεσία, η υπάρχουσα βλάστηση, οι ημερομηνίες κατεργασίας με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, κατεργασίες με οργανικά και ανόργανα λιπάσματα, προσθήκες βιολογικών υλικών ή τυχαίες επιμολύνσεις. Ο επιλεγμένος τόπος για τη συλλογή εδάφους θα πρέπει να επιτρέπει τη μακροπρόθεσμη χρήση. Κατάλληλοι προς τούτο είναι μόνιμα βοσκοτόπια, αγροί με ετήσιες καλλιέργειες δημητριακών (εκτός αραβοσίτου) ή πυκνοσπαρμένοι με χλωρό λίπασμα. Ο επιλεγμένος τόπος δειγματοληψίας δεν θα πρέπει να έχει υποβληθεί σε κατεργασία με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών για ένα τουλάχιστον χρόνο πριν από τη δειγματοληψία. Επίσης, για έξι μήνες τουλάχιστον δεν θα πρέπει να έχει χρησιμοποιηθεί οργανικό λίπασμα Η χρήση ανόργανου λιπάσματος είναι αποδεκτή μόνον όταν είναι σύμφωνη με τις απαιτήσεις της καλλιέργειας και δεν θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα εδάφους παρά μόνον τρεις μήνες τουλάχιστον μετά από τη χρήση του λιπάσματος. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση εδάφους κατεργασμένου με λιπάσματα με γνωστές βιοκτόνες επιδράσεις (π.χ. κυαναμίδιο ασβεστίου).

Θα πρέπει να αποφεύγεται δειγματοληψία κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά μακρές περιόδους (μεγαλύτερες των 30 ημερών) ξηρασίας ή κατάκλυσης με νερό. Για οργωμένα εδάφη, τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται από βάθος 0 έως 20 cm. Για χορτολιβαδικές εκτάσεις (βοσκές) ή άλλα εδάφη τα οποία δεν οργώνονται για μακρότερες περιόδους (τουλάχιστον μία καλλιεργητική περίοδος), το μέγιστο βάθος δειγματοληψίας μπορεί να είναι ελαφρώς μεγαλύτερο από 20 cm (π.χ. έως 25 cm). Τα δείγματα εδάφους θα πρέπει να μεταφέρονται χρησιμοποιώντας δοχεία και κάτω από συνθήκες θερμοκρασίας που να εγγυώνται ότι δεν υπάρχει περίπτωση σημαντικής μεταβολής των αρχικών ιδιοτήτων του εδάφους.

1.6.3.2 *Αποθήκευση*

Προτιμάται η χρήση εδαφών προσφάτως συλλεγέντων από την τοποθεσία συλλογής. Εάν δεν μπορεί να αποφευχθεί η αποθήκευση στο εργαστήριο, τα εδάφη μπορούν να αποθηκεύονται στο σκοτάδι στους 4±2 °C για τρεις μήνες κατ' ανώτατο όριο. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των εδαφών, πρέπει να διασφαλίζεται η ύπαρξη αερόβιων συνθηκών. Εάν τα εδάφη συλλέγονται από περιοχές όπου είναι κατεψυγμένα για τρεις μήνες τουλάχιστον το χρόνο, μπορεί να εξεταστεί και η αποθήκευση για έξι μηνες στους - 18 °C. Πριν από κάθε πείραμα μετριέται η μικροβιακή βιομάζα των αποθηκευμένων εδαφών, ο άνθρακας δε στη βιομάζα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 % του συνολικώς περιεχομένου στο έδαφος οργανικού άνθρακα (βλ ενότητα 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Χειρισμός και προετοιμασία των εδαφών για τη δοκιμή**

1.6.4.1 *Προεπώαση*

Εφόσον το έδαφος αποθηκεύτηκε (βλ. ενότητες 1.6.4.2 και 1.7.1.3), συνιστάται προεπώαση για μια περίοδο μεταξύ 2 και 28 ημερών. Η θερμοκρασία και υγρασία του εδάφους κατά τη διάρκεια της προεπώασης θα πρέπει να είναι παρόμοιες με τις χρησιμοποιούμενες στη δοκιμή (βλ. ενότητες 1.6.4.2 και 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά*

Το έδαφος καθαρίζεται με το χέρι από τυχόν ενυπάρχοντα μεγάλα αντικείμενα (π.χ. πέτρες, μέρη φυτών, κλπ) και κατόπιν κοσκινίζεται εν υγρώ χωρίς υπερβολική ξήρανση για λήψη σωματιδίων μεγέθους μέχρι το πολύ 2 mm. Η υγρασία του δείγματος εδάφους θα πρέπει να ρυθμίζεται με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό σε τιμή μεταξύ 40 και 60 % της μέγιστης ικανότητας για συγκράτηση νερού.

1.6.5 **Προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας για εφαρμογή στο έδαφος**

Η υπό δοκιμή ουσία εφαρμόζεται κυρίως χρησιμοποιώντας κάποιον φορέα Ο φορέας μπορεί να είναι νερό (για υδατοδιαλυτές ουσίες) ή αδρανές στερεό όπως λεπτή χαλαζιακή άμμος (μέγεθος σωματιδίων: 0,1-0,5 mm). Άλλοι υγροί φορείς (π.χ. οργανικοί διαλύτες όπως ακετόνη, χλωροφόρμιο) εκτός νερού θα πρέπει να αποφεύγονται επειδή μπορεί να καταστρέψουν τη μικροχλωρίδα. Εφόσον ως φορέας χρησιμοποιείται άμμος, αυτή μπορεί να επιχρίεται με την υπό δοκιμή ουσία διαλελυμένη ή εναιωρούμενη σε κατάλληλο διαλύτη. Στις περιπτώσεις αυτές, ο διαλύτης θα πρέπει να απομακρύνεται με εξάτμιση πριν από την ανάμειξη με το έδαφος. Για άριστη κατανομή της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος, συνιστάται μια σχέση 10 g άμμου ανά χιλιόγραμμο εδάφους (ξηρού βάρους). Τα δείγματα-μάρτυρες υποβάλλονται σε κατεργασία με ισοδύναμη ποσότητα νερού και/ή χαλαζιακής άμμου μόνον.

Όταν δοκιμάζονται πτητικά χημικά, θα πρέπει να αποφεύγονται κατά το δυνατόν απώλειες κατά την κατεργασία και να γίνεται προσπάθεια για τη διασφάλιση ομοιογενούς κατανομής στο έδαφος (π.χ. η υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει να εγχύεται στο έδαφος σε διάφορα σημεία).

1.6.6 **Συγκεντρώσεις δοκιμής**

Όταν δοκιμάζονται προϊόντα προστασίας καλλιεργειών ή άλλα χημικά με προβλέψιμες περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις Η μικρότερη συγκέντρωση θα πρέπει να αντιπροσωπεύει τουλάχιστον τη μέγιστη ποσότητα που αναμένεται να φθάσει στο έδαφος υπό συνθήκες συναντώμενες στην πράξη ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση θα πρέπει να είναι πολλαπλάσια της μικρότερης συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις της προστιθέμενης στο έδαφος υπό δοκιμή ουσίας υπολογίζονται υποθέτοντας ομοιόμορφη ενσωμάτωση μέχρι βάθους 5 cm και φαινόμενη πυκνότητα εδάφους 1,5. Για αγροχημικά που εφαρμόζονται απευθείας στο έδαφος, ή για χημικά για τα οποία μπορεί να προβλεφθεί η ποσότητα που φθάνει στο έδαφος, οι συνιστώμενες συγκεντρώσεις δοκιμής είναι η μέγιστη Προβλεπόμενη Περιβαλλοντική Συγκέντρωση (ΠΠΣ) και το πενταπλάσιο αυτής της συγκέντρωσης. Ουσίες που αναμένεται να εφαρμοστούν σε εδάφη αρκετές φορές σε μια καλλιεργητική περίοδο θα πρέπει να δοκιμάζονται σε συγκεντρώσεις προκύπτουσες από τον πολλαπλασιασμό της ΠΠΣ επί το μέγιστο αναμενόμενο αριθμό εφαρμογών. Η μεγαλύτερη, ωστόσο, συγκέντρωση δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το δεκαπλάσιο του μέγιστου εφάπαξ ποσοστού εφαρμογής.

Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, χρησιμοποιείται γεωμετρική σειρά πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να καλύπτουν το εύρος που απαιτείται για τον προσδιορισμό των τιμών EC_x.

▼B

1.7 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.7.1 **Συνθήκες έκθεσης**

1.7.1.1 *Κατεργασία και έλεγχος*

Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, το εδαφικό δείγμα διαιρείται σε τρία τμήματα ίσου βάρους. Δύο τμήματα αναμειγνύονται με το φορέα που περιέχει το προϊόν, ενώ το άλλο αναμειγνύεται με το φορέα χωρίς το προϊόν (μάρτυρας). Τόσο για τα κατεργασμένα όσο και για τα ακατέργαστα εδάφη συνιστάται η παρασκευή τουλάχιστον τριών επαναληπτικών δειγμάτων. Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, το εδαφικό δείγμα χωρίζεται σε έξι τμήματα ίσου βάρους. Πέντε από τα δείγματα αναμειγνύονται με τον φορέα που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία, ενώ το έκτο δείγμα αναμειγνύεται με τον φορέα χωρίς το χημικό. Τόσο για τα κατεργασμένα, όσο και για τους μάρτυρες, συνιστάται η παρασκευή τριών επαναληπτικών δειγμάτων. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή ώστε να διασφαλίζεται η ομοιογενής κατανομή της υπό δοκιμή ουσίας στα κατεργασμένα εδαφικά δείγματα. Κατά τη διάρκεια της ανάμειξης, θα πρέπει να αποφεύγεται το έδαφος να λαμβάνει συμπαγή μορφή ή μορφή σβώλων.

1.7.1.2 *Επώαση των εδαφικών δειγμάτων*

Η επώαση των εδαφικών δειγμάτων μπορεί να γίνεται με δύο τρόπους: ως χύδην δείγματα κάθε κατεργασμένου και μη κατεργασμένου εδάφους ή ως σειρά επιμέρους και ταυτόσημου μεγέθους μερικών δειγμάτων κάθε κατεργασμένου και μη κατεργασμένου εδάφους. Ωστόσο, όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, η δοκιμή θα πρέπει να γίνεται μόνον μια σειρά επιμέρους μερικών δειγμάτων. Όταν τα εδάφη επωάζονται χύδην, προετοιμάζονται μεγάλες ποσότητες κάθε κατεργασμένου και μη εδάφους και τα προς ανάλυση μερικά δείγματα λαμβάνονται όπως απαιτείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Η αρχικώς προετοιμαζόμενη ποσότητα για κάθε κατεργασία και μαρτυρία εξαρτάται από το μέγεθος των μερικών δειγμάτων, τον αριθμό των επαναληπτικών δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για ανάλυση και τον αναμενόμενο μέγιστο αριθμό χρόνων δειγματοληψίας. Τα χύδην επωαζόμενα εδάφη θα πρέπει να αναμειγνύονται επισταμένως πριν από τη λήψη των μερικών δειγμάτων. Όταν τα εδάφη επωάζονται ως σειρά επιμέρους εδαφικών δειγμάτων, κάθε χύδην κατεργασμένο και μη έδαφος διαιρείται στον απαιτούμενο αριθμό μερικών δειγμάτων και τα τελευταία χρησιμοποιούνται όπως απαιτείται. Σε δοκιμές όπου μπορούν να αναμένονται περισσότεροι των δύο χρόνοι δειγματοληψίας, θα πρέπει να παρασκευάζεται ικανός αριθμός μερικών δειγμάτων ώστε να καλύπτονται, από πλευράς αριθμού, το σύνολο των επαναληπτικών δειγμάτων και των χρόνων δειγματισμού. Θα πρέπει να επωάζονται τουλάχιστον τρία επαναληπτικά δείγματα του υπό δοκιμή εδάφους υπό αερόβιες συνθήκες (βλ. ενότητα 1.7.1.1). Κατά τη διάρκεια όλων των δοκιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δοχεία με επαρκή κενό χώρο άνωθεν για να αποφεύγεται η ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών. Όταν δοκιμάζονται πτητικές ουσίες, η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται μόνον με μια σειρά επιμέρους μερικών δειγμάτων.

1.7.1.3 *Συνθήκες και διάρκεια δοκιμής*

Η δοκιμή εκτελείται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου 20±2 °C. Η υγρασία των εδαφικών δειγμάτων θα πρέπει να διατηρείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης ικανότητας συγκράτησης νερού του εδάφους (βλ. ενότητα 1.6.4.2) με διακύμανση ±5 %. Εφόσον χρειάζεται, μπορεί να προστεθεί απεσταγμένο, απιονισμένο νερό.

Η ελάχιστη διάρκεια των δοκιμών είναι 28 ημέρες. Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, συγκρίνονται οι ποσότητες του απελευθερούμενου διοξειδίου του άνθρακα ή καταναλισκόμενου οξυγόνου στα κατεργασμένα και στα δείγματα μάρτυρες. Εάν την 28η ημέρα διαφέρουν κατά ποσοστό άνω του 25 %, η δοκιμή συνεχίζεται μέχρις ότου ληφθεί διαφορά ίση ή μικρότερη του 25 %, ή για μέγιστο χρονικό διάστημα 100 ημερών, ανάλογα με το ποιο επιτυγχάνεται συντομότερα Για μη αγροχημικά, η δοκιμή τερματίζεται μετά 28 ημέρες. Την 28η ημέρα, προσδιορίζονται οι ποσότητες του απελευθερούμενου διοξειδίου του άνθρακα ή του καταναλισκόμενου οξυγόνου στα κατεργασμένα και στα δείγματα μάρτυρες και υπολογίζονται οι τιμές EC_x.

▼B

1.7.2 **Δειγματοληψία και ανάλυση εδαφών**

1.7.2.1 *Χρονογιάγραμμα δειγματοληψίας εδαφών*

Εάν δοκιμάζονται αγροχημικά, τα εδαφικά δείγματα υποβάλλονται σε ανάλυση προσδιορισμού ρυθμού αναπνοής προκαλούμενης από γλυκόζη κατά τις ημέρες 0, 7, 14 και 28. Εάν απαιτείται παρατεταμένη δοκιμή, θα πρέπει να γίνονται περαιτέρω μετρήσεις σε διαστήματα 14 ημερών μετά την 28η ημέρα.

Εάν δοκιμάζονται μη αγροχημικά, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής και τα εδαφικά δείγματα αναλύονται για τον προσδιορισμό της προκαλούμενης από τη γλυκόζη αναπνοής στην αρχή (ημέρα 0) και στο τέλος της περιόδου έκθεσης (28 ημέρες). Εφόσον κριθεί αναγκαίο, μπορεί να προστεθεί και μια ενδιάμεση μέτρηση, π.χ. την 7η ημέρα. Τα δεδομένα της 28ης ημέρας χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της τιμής EC_x του χημικού. Εφόσον επιθυμείται, για την εκτίμηση των αρχικών ποσοτήτων της μεταβολικώς ενεργού μικροβιακής βιομάζας στο έδαφος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δεδομένα από τα δείγματα-μάρτυρες της ημέρας 0(12).

1.7.2.2 *Μέτρηση ρυθμών αναπνοής προκαλούμενης από τη γλυκόζη*

Σε κάθε χρονικό σημείο δειγματιγμού, προσδιορίζεται ο επαγόμενος από τη γλυκόζη ρυθμός αναπνοής σε κάθε επαναληπτικό κατεργασμένο δείγμα και δείγμα-μάρτυρα. Τα εδαφικά δείγματα αναμειγνύονται με επαρκή ποσότητα γλυκόζης για την επίτευξη της άμεσης μέγιστης αναπνευστικής απόκρισης. Η ποσότητα γλυκόζης που χρειάζεται για την επίτευξη μέγιστης αναπνευστικής απόκρισης από δεδομένο έδαφος μπορεί να προσδιοριστεί σε προκαταρκτική δοκιμή χρησιμοποιώντας μια σειρά συγκεντρώσεων γλυκόζης (14). Ωστόσο, σε αμμώδη εδάφη με 0,5-1,5 % οργανικό άνθρακα, αρκεί συνήθως μια ποσότητα 2 000 mg έως 4 000 mg γλυκόζης ανά kg ξηρού βάρους εδάφους. Η γλυκόζη μπορεί να αλεστεί σε σκόνη με καθαρή χαλαζιακή άμμο (10 g άμμου/kg ξηρού βάρους εδάφους) και να αναμειχθεί ομοιογενώς με το έδαφος.

Τα τροποποιημένα με γλυκόζη εδαφικά δείγματα επωάζονται σε κατάλληλη συσκευή για τη μέτρηση ρυθμών αναπνοής είτε συνεχώς, κάθε ώρα, ή κάθε δύο ώρες (βλ. ενότητα 1.6.1) στους 20 ± 2 °C. Μετράται για 12 συνεχείς ώρες το απελευθερούμενο διοξείδιο του άνθρακα ή το καταναλισκόμενο οξυγόνο, οι δε μετρήσεις θα πρέπει να ξεκινούν όσο το δυνατόν συντομότερα, δηλ. μέσα σε 1 έως 2 ώρες από την προσθήκη της γλυκόζης. Μετριώνται οι συνολικές ποσότητες του απελευθερούμενου διοξειδίου του άνθρακα ή του καταναλισκόμενου οξυγόνου κατά τη διάρκεια των 12 ωρών και προσδιορίζονται οι μέσοι ρυθμοί αναπνοής.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Εάν διεξάγονται δοκιμές με αγροχημικά, θα πρέπει να καταγράφεται το απελευθερούμενο διοξείδιο του άνθρακα ή το καταναλισκόμενο οξυγόνο από κάθε επαναληπτικό δείγμα εδάφους και να παρατίθενται σε πίνακα οι μέσες τιμές όλων των επαναληπτικών δειγμάτων. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλες και γενικά αποδεκτές στατιστικές μεθόδους (π.χ. F-δοκιμή, 5 % επίπεδο σημαντικότητας). Οι ρυθμοί της επαγόμενης από γλυκόζη αναπνοής εκφράζονται mg διοξειδίου του άνθρακα/kg ξηρού εδαφους/h ή mg οξυγόνου/kg ξηρού βάρους εδάφους/h. Ο μέσος ρυθμός σχηματισμού διοξειδίου του άνθρακα ή ο μέσος ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου σε κάθε κατεργασία συγκρίνεται με εκείνον του μάρτυρα και υπολογίζεται η % απόκλιση από τον μάρτυρα.

▼B

Εάν πραγματοποιούνται δοκιμές με μη αγροχημικά, προσδιορίζονται οι ποσότητες του απελευθερούμενου διοξειδίου του άνθρακα ή του καταναλισκόμενου οξυγόνου σε κάθε επαναληπτικό δείγμα και χαράσσεται καμπύλη δόσης-απόκρισης για υπολογισμό των τιμών EC_x. Οι ανευρισκόμενοι ρυθμοί επαγόμενης από γλυκόζη αναπνοής (δηλ. mg διοξειδίου του άνθρακα/kg ξηρού βάρους εδάφους/h ή mg οξυγόνου/kg ξηρού βάρους δάφους/h) στα κατεργασμένα δείγματα μετά 28 ημέρες συγκρίνονται με τους ανευρισκόμενους στο μάρτυρα. Από τα στοιχεία αυτά, υπολογίζονται οι % τιμές αναστολής για κάθε συγκέντρωση δοκιμής. Τα ποσοστά αυτά καταγράφονται γραφικώς συναρτήσει της συγκεντρώσεως και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται στατιστικές διαδικασίες για τον υπολογισμό των τιμών EC_x. Προσδιορίζονται επίσης όρια εμπιστοσύνης ($\rho = 0,95$) για τις υπολογιζόμενες τιμές EC_x χρησιμοποιώντας τυποποιημένες διαδικασίες (15)(16)(17).

2.2 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όταν υπολογίζονται αποτελέσματα από δοκιμές με αγροχημικά και η διαφορά στους ρυθμούς αναπνοής μεταξύ της με χαμηλότερο ποσοστό κατεργασίας (δηλ. της μέγιστης προβλεπόμενης συγκέντρωσης) και μάρτυρα είναι ίση ή μικρότερη του 25 % σε οποιοδήποτε χρόνο δειγματοληψίας μετά την 28η ημέρα, το προϊόν μπορεί να αξιολογηθεί ως μη έχον μακροπρόθεσμη επίδραση στη μετατροπή του άνθρακα στα εδάφη. Όταν αξιολογούνται αποτελέσματα από δοκιμές με χημικά άλλα εκτός των αγροχημικών, χρησιμοποιούνται οι τιμές EC_{50}, EC_{25} καν/ή EC_{10}.

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Πλήρη ταυτοποίηση του χρησιμοποιηθέντος εδάφους, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

— γεωγραφικό στίγμα του τόπου (γεωγραφικό πλάτος και μήκος)

— πληροφορίες για το ιστορικό του τόπου (δηλ. κάλυψη από βλάστηση, κατεργασίες με προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, κατεργασίες με λιπάσματα, τυχαία επιμόλυνση, κλπ)

— πρότυπο χρήσης (π.χ. γεωργικό έδαφος, δάσος, κλπ.)

— βάθος δειγματοληψίας (cm);

— περιεκτικότητα σε άμμο/ιλύ/άργιλο (% επί ξηρού βάρους)

— pH (στο νερό)

— περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (% επί ξηρού βάρους)

— περιεκτικότητα σε άζωτο (% επί ξηρού βάρους)

— κατιοανταλλακτική ικανότητα (mmol/kg)

— αρχική μικροβιακή βιομάζα ως ποσοστό του συνολικού οργανικού άνθρακα

— αναφορά των χρησιμοποιηθεισών μεθόδων για τον προσδιορισμό κάθε παραμέτρου

— κάθε πληροφορία σχετικά με τη συλλογή και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων

— λεπτομέρειες για την προεπώαση του εδάφους, εφόσον συντρέχει

▼B

Υπό δοκιμή ουσία:

— φυσική υπόσταση της ουσίας και, όπου χρειάζεται, φυσικοχημικές ιδιότητες

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης, όπου χρειάζεται, συμπεριλαμβανομένου του χημικού τύπου, της καθαρότητας (δηλ. για προϊόντα προστασίας καλλιεργειών, το ποσοστό του δραστικού συστατικού), περιεκτικότητα σε άζωτο.

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομέρειες της τροποποίησης του εδάφους με οργανικό υπόστρωμα,

— αριθμός χρησιμοποιηθεισών συγκεντρώσεων του υπό δοκιμή χημικού και, όπου κρίνεται σκόπιμο, αιτιολόγηση των επιλεγεισών συγκεντρώσεων,

— λεπτομέρειες για την εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος,

— θερμοκρασία επώασης,

— υγρασία εδάφους στη αρχή και κατά τη διάρκεια της δοκιμής,

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος επώασης εδάφους (δηλ. χύδην ή ως σειρά επιμέρους μερικών δειγμάτων),

— αριθμός επαναληπτικών δειγμάτων,

— χρόνοι δειγματοληψίας.

Αποτελέσματα:

— χρησιμοποιηθείσα μέθοδος και εξοπλισμός για τη μέτρηση των ρυθμών αναπνοής

— δεδομένα σε μορφή πίνακα, συμπεριλαμβανομένων μεμονωμένων και μέσων τιμών ποσοτήτων διοξειδίου του άνθρακα ή οξυγόνου

— διακύμανση μεταξύ των επαναληπτικών δειγμάτων σε κατεργασμένα δείγματα και σε δείγματα μάρτυρες

— εξηγήσεις διορθώσεων που έγιναν στους υπολογισμούς, εφόσον συντρέχει περίπτωση

— η % διακύμανση των επαγόμενων από τη γλυκόζη ρυθμών αναπνοής σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ή, εάν κρίνεται σκόπιμο, η τιμή EC_{50} με 95 % όριο εμπιστοσύνης, άλλες τιμές EC_x (π.χ. EC_{25} ή EC_{10}) με διαστήματα εμπιστοσύνης και ένα γράφημα της καμπύλης δόσης-απόκρισης

— στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων, όπου χρειάζεται

— κάθε πληροφορία και παρατήρηση χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in «Pesticide Effects on Soil Microflora». Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in «Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph N^{o} 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41:831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Γ.23. **ΑΕΡΟΒΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ**

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής είναι αναπαραγωγή της OECD TG 307 (2002)

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής βασίζεται σε υφιστάμενες κατευθυντήριες οδηγίες (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Η περιγραφόμενη στο παρόν μέθοδος δοκιμής σχεδιάστηκε για την εκτίμηση της αερόβιας και αναερόβιας μετατροπής χημικών στο έδαφος. Τα πειράματα εκτελούνται για τον προσδιορισμό (i) του ρυθμού μετατροπής της υπό δοκιμή ουσιας, και (ii) της φύσης και των ρυθμών σχηματισμού και απομάκρυνσης πρσιόντων μετατροπής στα οποία μπορεί να εκτεθούν και οργανισμοί του εδάφους. Τέτοιες μελέτες απαιτούνται για χημικά τα οποια εφαρμόζονται απευθειας στο έδαφος ή τα σποία είναι πιθανόν να φθάσουν στο εδαφικό περιβάλλον. Τα αποτελέσματα των εργασιηριακών αυτών μελετών μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την κατάρτιση πρωτοκόλλων δειγματοληψίας και ανάλυσης σε σχετικές επιτόπιες μελέτες.

Για την αξιαλόγηση της πορείας μετατροπής αρκούν γενικά αερόβιες και αναερόβιες μελέτες με ένα τύπο εδάφους (8)(10)(11). Οι ρυθμοί μετατροπής θα πρέπει να προσδιοριξονται σε τρία τουλάχιστον πρόσθετα εδάφη (8)(10).

Σε συνάντηση ανταλλαγής απόψεων του ΟΟΣΑ σχετικά με την επιλογή και ιζημάτων, η οποία έλαβε χώρα στην Belgirate στην Ιταλια το 1995 (7) επήλθε συμφωνια, ειδικότερα, για τον αριθμό και τον τύπο των προς χρήση εδαφών στγν οαριύσα δοκιμή. Οι τύποι των υποβαλλόμενων σε δοκιμή εδαφών θα πρέπει να ειναι αντιπροσωπευτικοί των περιβαλλοντικών συνθηκών όπου πραγματοποιείται χρήση ή επέρχεται απελευθέρωση. Για παράδειγμα, χημικά τα οπσια μπορει να απελευθερώνονται σε υποτρσπικά έως τροπικά κλιματα θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή με Ferrasols ή Nitosols (σύστημα FAO). Στη συνάντηση, δόθηκαν επίσης συστάοεις σχετικά με τη συλλογή, χειρισμό και αποθήκευση εδαφικών δειγμάτων, με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες του ISO (15). Στην παρούσα μέθοδο εξετάζεται επίσης και χσήση ορυζοεδαφών.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Ουσία δοκιμής: κάθε ουσία, αρχική ή σχετικά προιόντα μετατροπής

Προϊόντα μετατροπής: όλες οι ουσίες που προκύπτουν από ανπδράεις βιοτικής ή αβιοτικής μετατροπής της ουσίας δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του CO_2 και προϊότων σε δεσλεψλένα υπολείμματα.

Δεσλενμένα απιλείμματα: Ως «δεσμευμένα υπολειμματα» χαρακτηρίζονται ενώσεις στο έδαφος, σε φυτά ή σε ζώα, οι σποίες παραμένουν στο υπόστρωμα με τη μορφή της αρχικής ουσίας ή μεταβολιτών της/προϊόντων μετατροπής μετά από εκχύλιση. Η μέθοδος εκχυλίσεως πρέπει να μεταβάλλει συσιαστικώη αυτές καθ' αυτές τις ενώσεις ή τη δομή του υποστρώματος. Η φύση του δεσμού μπορεί να προσδιοπριστει εν μέρει με τη βοήθεια μεθόδων εκχυλίσεως που μεταβάλλουν το υπόστρωμα και εξειδικευμένες αναλντικές τεχνικές. Μέχσι σήμερα, για παράδειγλα, έχσυν ταυτοποιηθεί με τον τρόπο αυτό ομοιοπολικσι, ιονικσι και ροφητικοί δεσμοί, καθώς επίσης και παψιδεύσεις. Γενικά, ο σχηματισμός δεσμευμένων υπολειμμάτων μειώει σημανπκώς τη βιοπροσβασιμότητα και βιοδιαθεσιμότητα (12) [τροποποιηση από IUPAC 1984 (13)].

Αερόβια μετατραπή: ανπδράσεις που λαμβάνουν χώρα παρουσια μοριακού οξυγόνου (14).

▼B

Αναερόβια μετατροπή: (αναγωγική): αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα απουσία μοριακού οξυλόνου (14).

Έδαφος: μίγμα ανόργανων και οργανικών χημικών συστατικών, όπου στα τελευταία περιλαμβάνονται ενώσεις υψηλής περιεκτικότητας σε άνθρακα και άζωτο και υψηλού μοριακού βάρους, στο οποίο εμφανίζεται ζωή με τη μορφή μικρών (κυρίως μικρο-) οργανισμών. Το έδαφος μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπό δύο καταστάσεις:

(α) αδιατάρακτο, όπως έχει διαμορφωθεί με τον καιρό, σε χαρακτηριστικά σιρώματα διαγόρων τύπων εδαφών

(β) διαταραγμένο, όπως συνήθως βρίσκεται σε αρώσιμες εκτάσεις ή όπως εμφανίζεται όταν λαμβάνονται δείγματα με σκάψιμο και χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμής (14).

Ανοργανοποίηση: η πλήρης αποικοδόμηση μιας οργανικής ενώσεως σε $C0_2$, H_20 υπό αερόβιες συνθήκες και CH_4, $C0_2$ και H_20 υπό αναερόβιες συνθήκες. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμής, όταν χρησιμοποιείται επισημασμένη με ^{14}C ένωση, ανοργανοποίηση σημαίνει εκτεταμένη αποικοδόμηση κατά την οποία επισημασμένο άτομο άνθρακα οξειδώνεται με απελευθέρωση αντίστοιχης ποσότητας $^{14}C0_2$ (14).

Χρόνος ημιζωής, $t_{0,5}$, είναι ο χρόνος που απαιτείται για την κατά 50 % μετατροπή της ουσίας δοκιμής, όταν η κινητική της αντιδράσεως μετατροπής είναι πρώτης τάξεως είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης.

DT_{50} (Χρόνος μειώσεως 50): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 50 %. Διαφέρει από το χρόνο ημιζωής $t_{0,5}$ όταν η μετατροπή δεν ακολουθεί κινητική αντιδράσεως πρώτης τάξεως.

DT_{75} (Χρόνος μειώσεως 75): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 75 %.

DT_{90} (Χρόνος μειώσεως 90): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 90 %.

1.3 ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για τον χαρακτηρισμό και/ή ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής με τη βοήθεια φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών μεθόδων, πρέπει να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς.

1.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε όλες τις χημικές ουσίες (μη επισημασμένες ή ραδιοεπισημασμένες) για τις οποίες υπάρχει διαθέσιμη αναλυτική μέθοδος ικανοποιητικής ακριβείας και ευαισθησίας. Εφαρμόζεται σε μη πτητικές ενώσεις, ελαφρώς πτητικές ενώσεις, υδατοδιαλυτές ενώσεις ή και σε υδατοαδιάλυτες ενώσεις. Η δοκιμή δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται σε ιδιαιτέρως πτητικές από το έδαφος χημικές ουσίες (π.χ. ατμίζουσες, οργανικοί διαλύτες), οι οποίες δεν μπορούν επομένως να διατηρηθούν στο έδαφος υπό τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας δοκιμής.

▼B

1.5 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΥΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για τη μέτρηση του ρυθμού μετατροπής μπορεί να χρησιμοποιηθεί επισημασμένη ή μη ουσία δοκιμής. Για τη μελέτη της πορείας μετατροπής και τον προσδιορισμό του ισοζυγίου μάζας, απαιτείται επισημασμένη ουσία. Συνιστάται η επισήμανση με ^{14}C, ωστόσο μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη και η χρήση άλλων ισοτόπων όπως ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Η επισήμανση θα πρέπει να γίνεται στο σταθερότερο ή σταθερότερα μέρη του μορίου ([1]), όσο αυτό είναι δυνατόν. Η καθαρότητα της ουσίας δοκιμής πρέπει να είναι τουλάχιστον 95 %.

Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμής αερόβιας ή αναερόβιας μετατροπής στο έδαφος, θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα τα ακόλουθα στοιχεία σχετικά με την ουσία δοκιμής:

(α) διαλυτότητα σε νερό (Μέθοδος Α.6)

(β) διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες

(γ) τάση ατμών (Μέθοδος Α.4) και η σταθερά του νόμου του Henry

(δ) συντελεστής κατανομής σε n-οκτανόλη/νερό (Μέθοδος Α.8)

(ε) χημική σταθερότητα στο σκοτάδι (υδρόλυση) (Μέθοδος C.7);

(στ) η pK_a, εάν κάποιο μόριο μπορεί να υποστεί πρωτονίωση ή αποπρωτονίωση [Κατ. οδ. ΟΟΣΑ 112] (16).

Άλλες χρήσιμες πληροφορίες μπορεί να είναι δεδομένα για την τοξικότητα της ουσίας δοκιμής στους μικροοργανισμούς του εδάφους [Μέθοδοι δοκιμής C.21 και C.22] (16).

Θα πρέπει επίσης να υπάρχουν διαθέσιμες αναλυτικές μέθοδοι (συμπεριλαμβανομένων και μεθόδων εκχυλίσεως και καθαρισμού) για την ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής της.

1.6 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Δείγματα εδάφους υποβάλλονται σε κατεργασία με την ουσία δοκιμής και επωάζονται στο σκοτάδι σε βιομετρικές φιάλες ή σε συστήματα διελεύσεως ροής υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες (σε σταθερή θερμοκρασία και υγρασία εδάφους) Σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα, δείγματα εδάφους εκχυλίζονται και αναλύονται όσον αφορά την αρχική ουσία και τα προϊόντα μετατροπής. Συλλέγονται, επίσης, για ανάλυση και πτητικά προϊόντα χρησιμοποιώντας κατάλληλες διατάξεις απορροφήσεως. Χρησιμοποιώντας επισημασμένο με ^{14}C υλικό, μπορούν να μετρηθούν οι διάφορες ταχύτητες ανοργανοποίησης παγιδεύοντας το εκλυόμενο $^{14}C0_2$ και να προσδιοριστεί ένα ισοζύγιο μάζας, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού δεσμευμένων στο έδαφος υπολειμμάτων.

1.7 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

1.7.1 **Ανάκτηση**

Από την εκχύλιση και ανάλυση διπλών, τουλάχιστον, εδαφικών δειγμάτων αμέσως μετά την προσθήκη της ουσίας δοκιμής, προκύπτει μια πρώτη ένδειξη της επαναληψιμότητας της αναλυτικής μεθόδου και της ομοιομορφίας της διαδικασίας εφαρμογής για την ουσία δοκιμής. Οι τιμές ανάκτησης σε μεταγενέστερα στάδια των πειραμάτων προκύπτουν από τα αντίστοιχα ισοζύγια μάζας. Τα ποσοστά ανάκτησης θα πρέπει να κυμαίνονται από 90 έως 110 % για επισημασμένες χημικές ουσίες (8) και από 70 έως 110 % για μη επισημασμένες χημικές ουσίες (3).

([1]) Για παράδειγμα, αν η ουσία περιέχει έναν δακτύλιο, απαιτείται επισήμανση στον δακτύλιο αυτό αν η ουσία δοκιμής περιέχει δύο ή περισσοτέρους δακτυλίους, ίσως χρειαστεί η διεξαγωγή ξεχωριστών μελετών για την αξιολόγηση της τύχης κάθε επισημασμένου δακτυλίου και για τη λήψη καταλλήλων πληροφοριών για το σχηματισμό προϊόντων μετατροπής.

▼B

1.7.2 **Επαναληψιμότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου**

Η επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου (μη συμπεριλαμβανομένης της αποδοτικότητας της αρχικής εκχυλίσεως) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής, μπορεί να ελεγχθεί με τη βοήθεια διπλής αναλύσεως του ίδιου εδαφικού εκχυλίσματος, μετά ικανή επώαση για τον σχηματισμό προϊόντων μετατροπής.

Το όριο ανιχνεύσεως (LOD) της αναλυτικής μεθόδου για την ουσία δοκιμής και για τα προϊόντα μετατροπής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,01 $mg.kg^{-1}$ εδάφους (ως ουσία δοκιμής) ή 1 % της αρχικής εφαρμοσθείσας δόσεως, όποια τιμή από τις δύο είναι χαμηλότερη. Θα πρέπει επίσης να προσδιορίζεται και το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ)

1.7.3 **Ακρίβεια δεδομένων μετατροπής**

Από την ανάλυση αναγωγής των συγκεντρώσεων της ουσίας δοκιμής ως συνάρτησης του χρόνου, προκύπτουν τα σχετικά στοιχεία για την αξιοπιστία της καμπύλης μετατροπής και είναι δυνατός ο υπολογισμός των ορίων εμπιστοσύνης για τους χρόνους ημιζωής (αν ισχύει κινητική ψευδο-πρώτης τάξως) ή τις τιμές DT_{50} και, όπου κρίνεται σκόπιμο, DT_{75} και DT_{90}.

1.8 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.8.1 **Εξοπλισμός και χημικά αντιδραστήρια**

Τα συστήματα επωάσεως αποτελούνται από στατικά κλειστά συστήματα ή κατάλληλα συστήματα διελεύσεως ροής (7)(17). Παραδείγματα κατάλληλων συσκευών διελεύσεως ροής για επώαση εδάφους και φιαλών τύπου βιομέτρου εμφαίνονται στα σχήματα 1 και 2, αντίστοιχα. Αμφότεροι οι τύποι συστημάτων επώασης έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (7)(17).

Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

— Αναλυτικά όργανα όπως GLC, HPLC, TLC-εξοπλισμός, συμπεριλαμβανομένων των κατάλληλων συστημάτων ανίχνευσης για την ανάλυση ραδιοεπισημασμένων ή μη επισημασμένων ουσιών ή μεθόδου ανάστροφης αραίωσης ισοτόπων

— Όργανα για σκοπούς ταυτοποίησης (π.χ. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, κλπ)

— Υγρός απαριθμητής σπινθηρισμών

— Οξειδωτικό σύστημα για την καύση ραδιενεργού υλικού

— Φυγόκεντρος

— Συσκευή εκχυλίσεως (π.χ., σωλήνες φυγοκέντρου για ψυχρή εκχύλιση και συσκευή Soxhlet για συνεχή εκχύλιση υπό αναρροή)

— Όργανα συμπύκνωσης διαλυμάτων και εκχυλισμάτων (π.χ. περιστροφικός εξατμιστήρας)

— Υδρόλουτρο

— Διάταξη μηχανικής ανάμειξης (π.χ. μηχανή μαλάξεως, περιστροφικός αναμεικτήρας).

▼B

Στα χρησιμοποιούμενα χημικά αντιδραστήρια περιλαμβάνονται, π.χ.:

— NaOH, αναλυτικής καθαρότητας, 2 mol· dm^{-3}, ή άλλη κατάλληλη βάση (π.χ. KOH, αιθανολαμίνη)

— H_2S0_4, αναλυτικής καθαρότητας, 0,05 mol· dm^{-3}

— Αιθυλενογλυκόλη, αναλυτικής καθαρότητας;

— Στερεά απορροφητικά υλικά όπως νατράσβεστος και βύσματα πολυουρεθάνης

— Οργανικοί διαλύτες, αναλυτικής καθαρότητας, όπως ακετόνη, μεθανόλη, κλπ.

— Υγρό σπινθηρισμών.

1.8.2 **Εφαρμογή ουσίας δοκιμής**

Για την προσθήκη και κατανομή στο έδαφος, η ουσία δοκιμής μπορεί να διαλυθεί σε νερό (απιονισμένο ή απεσταγμένο) ή, όταν είναι αναγκαίο, σε ελάχιστες ποσότητες ακετόνης ή άλλων οργανικών διαλυτών (6) όπου η ουσία δοκιμής είναι επαρκώς διαλυτή και σταθερή. Ωστόσο, η ποσότητα του επιλεγόμενου διαλύτη δεν θα πρέπει να έχει σημαντική επίδραση στην εδαφική μικροβιακή δραστικότητα (βλ. 1.5 και 1.9.2-1.9.3) Η χρήση διαλυτών που αναστέλουν τη μικροβιακή δράση, όπως το χλωροφόρμιο, το διχλωρομεθάνιο και άλλοι αλογονωμένοι διαλύτες, θα πρέπει να αποφεύγεται.

Η ουσία δοκιμής μπορεί να προστίθεται επίσης ως στερεό, π.χ. αναμεμειγμένη σε χαλαζιακή άμμο (6) ή σε μικρό μερικό δείγμα του υπό δοκιμή εδάφους που έχει ξηρανθεί με αέρα και αποστειρωθεί. Εάν η ουσία δοκιμής προστεθεί χρησιμοποιώντας κάποιο διαλύτη, ο διαλύτης θα πρέπει να αφήνεται να εξατμιστεί πριν το μερικό δείγμα προστεθεί στο αρχικό μη στείρο εδαφικό δείγμα.

Για χημικά εν γένει, η κύρια οδός εισόδου των οποίων στο έδαφος είναι μέσω γεωργικής εφαρμογής/λάσπης υπονόμων, η υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει πρώτα να προστίθεται σε λάσπη που στη συνέχεια εισάγεται στο εδαφικό δείγμα, (βλ. ενότητες 1.9.2 και 1.9.3)

Δεν συνιστάται η συνήθης χρήση τυποποιημένων στη σύνθεση προϊόντων. Ωστόσο, για μη ευκόλως διαλυόμενες ουσίες δοκιμής, η χρήση τυποποιημένου υλικού μπορεί να είναι μια κατάλληλη εναλλακτική λύση.

1.8.3 **Εδάφη**

1.8.3.1 *Επιλογή εδαφών*

Για τον προσδιορισμό της πορείας μετατροπής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα αντιπροσωπευτικό έδαφος συνιστάται κάποιο αμμώδες αργιλούχο ή λασπώδες αργιλούχο ή αργιλώδες έδαφος ή αργιλώδης άμμος (sandy loam/silty loam/loam/loamy sand) [σύμφωνα με την ταξινόμηση FAO και USDA (18)] με ρΗ 5,5-8,0, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα 0,5-2,5 % και μικροβιακή βιομάζα τουλάχιστον 1 % του συνολικού οργανικού άνθρακα (10).

Για μελέτες ρυθμού μετατροπής θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία ακόμη εδάφη που να αντιπροσωπεύουν μια σειρά σχετικών εδαφών. Τα εδάφη θα πρέπει να ποικίλουν από πλευράς περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, ρΗ, περιεκτικότητα σε άργιλο και μικροβιακή βιομάζα (10).

▼B

Όλα τα εδάφη θα πρέπει να χαρακτηρίζονται, τουλάχιστον, ως προς την υφή τους (% άμμος, % ιλύς, % άργιλος) [σύμφωνα με την ταξινόμηση FAO και USDA (18)], το pH, την κατιοανταλλακτική τους ικανότητα, την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, τη φαινόμενη πυκνότητα, τις ιδιότητές του ως προς τη συγκράτηση νερού ([1]) και τη μικροβιακή βιομάζα (για αερόβιες μόνο μελέτες). Τυχόν πρόσθετες πληροφορίες για τις ιδιότητες των εδαφών μπορεί να είναι χρήσιμες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των εδαφών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι μέθοδοι που συνιστώνται στις παραπομπές (19)(20)(21)(22)(23). Η μικροβιακή βιομάζα θα πρέπει να προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της επαγόμενης υπό του υποστρώματος αναπνοής (SIR) (25)(26) ή εναλλακτικές μεθόδους (20).

1.8.3.2 *Συλλογή, χειρισμός και αποθήκευση εδαφών*

Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες λεπτομερείς πληροφορίες για το ιστορικό του τόπου απ' όπου συλλέγεται το προς δοκιμή έδαφος. Στις πληροφορίες περιλαμβάνονται ο ακριβής τόπος, η κάλυψη από βλάστηση, κατεργασίες με χημικά, κατεργασίες με οργανικά και ανόργανα λιπάσματα, προσθήκες βιολογικών υλικών ή άλλη μόλυνση. Εάν εδάφη έχουν υποστεί κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία ή δομικά της ανάλογα μέσα στα προηγούμενα τέσσερα χρόνια, αυτά δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για μελέτες μετατροπής (10)(15).

Το έδαφος θα πρέπει να έχει συλλεγεί πρόσφατα από τον τόπο προέλευσης (από τον ορίζοντα Α ή την άνω στιβάδα πάχους 20 cm) με περιεκτικότητα σε νερό τέτοια που να διευκολύνει το κοσκίνισμα. Για εδάφη άλλα εκείνων από ορυζώνες, η δειγματοληψία θα πρέπει να αποφεύγεται κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά μακρές περιόδους (> 30 ημέρες) ξηρασίας, παγετού ή πλημμυρών (14). Τα δείγματα θα πρέπει να μεταφέρονται με τρόπο που να ελαχιστοποιεί μεταβολές στην υγρασία του εδάφους και θα πρέπει να διατηρούνται στο σκοτάδι με ελεύθερη πρόσβαση αέρα, κατά το δυνατόν. Μια χαλαρά δεμένη σακούλα πολυαιθυλενίου είναι γενικά κατάλληλη για το σκοπό αυτό.

Το έδαφος θα πρέπει να υποβάλλεται σε κατεργασία το συντομότερο δυνατό μετά τη δειγματοληψία. Βλάστηση, μεγάλου μεγέθους εδαφική πανίδα και πέτρες θα πρέπει να απομακρύνονται πριν από τη διέλευση του εδάφους μέσω κοσκίνου 2 mm που απομακρύνει μικρές πέτρες, πανίδα και υπολείμματα φυτών. Θα πρέπει να αποφεύγεται εκτεταμένη ξήρανση και σύνθλιψη του εδάφους πριν από το κοσκίνισμα (15).

Όταν το χειμώνα είναι δύσκολη η δειγματοληψία στο ύπαιθροό (παγωμένο έδαφος ή καλυμμένο από στιβάδες χιονιού), αυτή μπορεί να γίνει από εδάφη θερμοκηπίου υπό φυτική κάλυψη (π.χ. χλόη ή μίγματα χλόης-τριφυλιού). Προτιμώνται οπωσδήποτε.εδάφη προσφάτως συλλεγμένα από την ύπαιθρο, εάν όμως το συλλεγέν και επεξεργασθέν χώμα πρέπει να αποθηκευθεί πριν από την έναρξη της μελέτης, οι συνθήκες αποθήκευσης πρέπει να είναι κατάλληλες και για περιορισμένο χρονικό διάστημα μόνο (4 ± 2 °C το πολύ για τρεις μήνες) για διατήρηση της μικροβιακής δραστικότητας ([2]). Λεπτομερείς οδηγίες για τη συλλογή, το χειρισμό και την αποθήκευση των εδαφών που προορίζονται να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα βιομετατροπής μπορούν να βρεθούν στα (8)(10)(15)(26)(27).

([1]) Το χαρακτηριστικό της συγκράτησης νερού από ένα έδαφος μπορεί να μετρηθεί ως επί του πεδίου ικανότητα, ως ικανότητα συγκράτησης νερού ή ως τάση ρόφησης νερού (pF). Για εξηγήσεις, βλ. παράρτημα 1. Θα πρέπει να αναφέρεται στην έκθεση δοκιμής αν τα χαρακτηριστικά της συγκράτησης νερού και της φαινομενικής πυκνότητας των εδαφών προσδιορίστηκαν σε αδιατάρακτα δείγματα πεδίου ή σε διαταραγμένα (επεξεργασμένα) δείγματα.

([2]) Πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι εδάφη από εύκρατες ζώνες μπορούν να αποθηκευτούν και στους - 20 °C για περισσότερους από τρεις μήνες (28)(29) χωρίς σημαντικές απώλειες μικροβιακής δραστικότητας.

▼B

Προτού το επεξεργασμένο χώμα χρησιμοποιηθεί για την παρούσα δοκιμή, θα πρέπει να προεπωάζεται για να επέρχεται φύτρωμα και απομάκρυνση των σπόρων και να αποκαθίσταται εκ νέου ισορροπία μικροβιακού μεταβολισμού μετά την αλλαγή από συνθήκες δειγματοληψίας ή αποθήκευσης σε συνθήκες επώασης. Γενικά, αρκεί περίοδος προεπώασης μεταξύ 2 και 28 ημερών με πλησίστιες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας με εκείνες της πραγματικής δοκιμής (15). Ο χρόνος αποθήκευσης και προεπώασης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει συνολικά τους τρεις μήνες.

1.9 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.9.1 **Συνθήκες δοκιμής**

1.9.1.1 *θερμοκρασία δοκιμής*

Κατά τη διάρκεια της όλης περιόδου δοκιμής, τα εδάφη θα πρέπει να επωάζονται στο σκοτάδι σε σταθερή θερμοκρασία αντιπροσωπευτική των κλιματικών συνθηκών όπου θα γίνει χρήση ή θα επέλθει απελευθέρωση. Για όλες τις ουσίες δοκιμής που μπορεί να φθάσουν στο έδαφος σε εύκρατα κλίματα, συνιστάται θερμοκρασία 20 ± 2 °C. Η θερμοκρασία θα πρέπει να ελέγχεται.

Για χημικές ενώσεις χρησιμοποιούμενες ή απελευθερούμενες σε ψυχρότερα κλίματα (π.χ. σε βόρειες χώρες, κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου/χειμώνα), θα πρέπει να επωάζονται πρόσθετα εδαφικά δείγματα και σε χαμηλότερη θερμοκρασία (π.χ. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2 *Υγρασία*

Σε δοκιμές μετατροπής υπό αερόβιες συνθήκες, η υγρασία του εδάφους ([1]) θα πρέπει να προσαρμόζεται και να διατηρείται σε τιμές pF μεταξύ 2,0 και 2,5 (3)· Η υγρασία του εδάφους εκφράζεται ως μάζα ύδατος ανά μάζα ξηρού εδάφους και θα πρέπει να ελέγχεται τακτικά (π.χ. ανά δύο εβδομάδες) ζυγίζοντας τις φιάλες επώασης και αναπληρώνοντας τις υδατικές απώλειες με προσθήκη νερού (κατά προτίμηση διηθημένο σε στείρο περιβάλλον νερό βρύσης). Θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια για την πρόληψη ή ελαχιστοποίηση απωλειών ουσίας δοκιμής και/ή προϊόντων μετατροπής λόγω διαφυγής πτητικών συστατικών και/ή τυχόν φωτοαποικοδόμησης κατά τη διάρκεια προσθήκης υγρασίας.

Σε δοκιμές μετατροπής υπό αναερόβιες και συνθήκες ορυζώνων, το χώμα κορέννυται σε νερό με κατάκλυση.

1.9.1.3 *Αερόβιες συνθήκες επώασης*

Στα συστήματα διελεύσεως ροής, οι αερόβιες συνθήκες διατηρούνται με ενδιάμεσες αποχύσεις ή με συνεχή αερισμό με ένυγρο αέρα. Στις βιομετρικές φιάλες, η ανταλλαγή αέρα διατηρείται με διάχυση.

1.9.1.4 *Στείρες αερόβιες συνθήκες*

Για τη λήψη πληροφοριών όσον αφορά τη σπουδαιότητα της αβιοτικής μετατροπής μιας ουσίας δοκιμής, τα εδαφικά δείγματα μπορούν να αποστειρώνονται (για μεθόδους αποστείρωσης βλ. παραπομπές 16 και 29), να υποβάλλονται σε κατεργασία με στείρα ουσία δοκιμής (π.χ. προσθήκη διαλύματος μέσω στείρου φίλτρου) και να αερίζονται με ένυγρο στείρο αέρα όπως περιγράφεται στο 1.9.1.3. Στην περίπτωση εδαφών ορυζώνα, έδαφος και νερό θα πρέπει να αποστειρώνονται και η επώαση να εκτελείται όπως περιγράφεται στο 1.9.1.6.

([1]) Το έδαφος δεν θα πρέπει να είναι ούτε πολύ υγρό ούτε πολύ ξηρό για τη διατήρηση επαρκούς αερισμού και διατροφής της μικροχλωρίδας του εδάφους. Οι συνιστώμενες τιμές υγρασίας για άριστη μικροβιακή ανάπτυξη είναι από 40-60 % ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC) και από 0,1-0,33 bar (6). Η τελευταία περιοχή ισοδυναμεί με περιοχή pF 2,0-2,5. Τυπικές τιμές υγρασίας διαφόρων τύπων εδαφών δίδονται στο παράρτημα 2.

▼B

1.9.1.5 *Αναερόβιες συνθήκες επώασης*

Για την αποκατάσταση και διατήρηση αναερόβιων συνθηκών, το έδαφος, αφού υποστεί κατεργασία με την ουσία δοκιμής και επωαστεί υπό αερόβιες συνθήκες επί 30 ημέρες ή για χρονικό διάστημα αντιστοιχούν σε μια ημιζωή ή DT_{50} (όποιο χρονικό διάστημα είναι συντομότερο), στη συνέχεια κατακλύζεται με νερό (υδατική στιβάδα 1-3 cm) και το σύστημα επώασης καθαρίζεται με αδρανές αέριο (π.χ. άζωτο ή αργό) ([1]). Το σύστημα δοκιμής πρέπει να επιτρέπει τη διενέργεια μετρήσεων παραμέτρων όπως το pH, η συγκέντρωση οξυγόνου και το δυναμικό οξειδοαναγωγής και να περιλαμβάνει διατάξεις παγίδευσης για πτητικά προϊόντα. Το βιομετρικό σύστημα πρέπει να είναι κλειστό για να αποφεύγεται η είσοδος αέρα με διάχυση.

1.9.1.6 *Επώαση υπό συνθήκες αναπτυσσόμενης (μη αποφλοιωμένης) όρυζας*

Για τη μελέτη της μετατροπής σε εδάφη αναπτυσσόμενης όρυζας, το χώμα κατακλύζεται με στρώμα νερού πάχους 1-5 cm και στην υδατική φάση προσάγεται η ουσία δοκιμής (9). Συνιστάται βάθος εδάφους τουλάχιστον 5 cm. Το σύστημα αερίζεται με αέρα ως υπό αερόβιες συνθήκες. Θα πρέπει να παρακολουθείται και να αναφέρεται το pH, η συγκέντρωση οξυγόνου και το δυναμικό οξειδοαναγωγής της υδατικής στιβάδας. Πριν από την έναρξη της μελέτης μετατροπής, απαιτείται περίοδος προεπώασης τουλάχιστον δύο εβδομάδων (βλ. ενότητα 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Διάρκεια δοκιμής*

Οι μελέτες ρυθμού και πορείας δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνουν τις 120 ημέρες ([2]) (3)(6)(8), διότι στη συνέχεια θα πρέπει να αναμένεται με το χρόνο μείωση της μικροβιακής δραστικότητας του εδάφους δεδομένου ότι πρόκειται για τεχνητό εργαστηριακό· σύστημα απομονωμένο από φυσικό ανεφοδιασμό. Όπου είναι αναγκαίο για το χαρακτηρισμό της μείωσης της ουσίας δοκιμής και το σχηματισμό και απομάκρυνση βασικών προϊόντων μετατροπής, οι μελέτες μπορούν να συνεχίζονται για μεγαλύτερες περιόδους (π.χ. 6 ή 12 μήνες) (8). Τυχόν μεγαλύτερες περίοδοι επώασης θα πρέπει να αιτιολογούνται στην έκθεση δοκιμής και να συνοδεύονται από μετρήσεις βιομάζας κατά τη διάρκεια και στο τέλος των περιόδων αυτών.

1.9.2 **Εκτέλεση της δοκιμής**

Σε κάθε φιάλη επωάσεως φέρονται περίπου 50 έως 200 g εδάφους (σε ξηρή βάση) (βλ. σχήματα 1 και 2 στο παράρτημα 3) και το έδαφος υποβάλλεται σε κατεργασία με την ουσία δοκιμής με μία από τις μεθόδους που περιγράφονται στο 1.8.2. Όταν για την προσαγωγή της ουσίας δοκιμής χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες, αυτοί θα πρέπει να απομακρύνονται από το έδαφος με εξάτμιση. Κατόπιν το έδαφος αναμειγνύεται επισταμένως με μια σπάτουλα και/ή με ανακίνηση της φιάλης. Εάν η μελέτη διεξάγεται υπό συνθήκες αναπτυσσόμενης όρυζας, έδαφος και νερό θα πρέπει να αναμειγνύονται επισταμένως μετά την εφαρμογή της ουσίας δοκιμής. Κατάλληλες μικρές ποσότητες (π.χ. 1 g) των κατεργασμένων εδαφών θα πρέπει να αναλύονται για την ουσία δοκιμής για να ελέγχεται αν υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή. Για εναλλακτική μέθοδο, βλ. κατωτέρω.

([1]) Σε επιφανειακά εδάφη, ακόμη και σε υποεπιφανειακά εδάφη, επικρατούν αερόβιες συνθήκες όπως φαίνεται από χρηματοδοτηθέν από την ΕΕ ερευνητικό έργο [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Αναερόβιες συνθήκες μπορούν να απαντηθούν μόνον περιοδικώς κατά τη διάρκεια πλημμυρών εδαφών μετά από ισχυρές βροχοπτώσεις ή όταν σε ορυζώνες δημιουργούνται συνθήκες αναπτυσσόμενης (μη αποφλοιωμένης) όρυζας (paddy conditions).

([2]) Οι αερόβιες μελέτες μπορεί να τερματιστούν πολύ πριν από τις 120 ημέρες υπό την προϋπόθεση ότι μέχρι το χρονικό αυτό σημείο έχουν φθάσει σαφώς στο τελικό τους σημείο η πορεία μετατροπής και η ανοργανοποίηση. Ο τερματισμός της δοκιμής είναι δυνατός και μετά 120 ημέρες, ή όταν έχει μετατραπεί το 90 % τουλάχιστον της ουσίας δοκιμής, αλλά μόνον εάν έχει σχηματιστεί τουλάχιστον 5 % $C0_2$.

▼B

Το ποσοστό κατεργασίας θα πρέπει να ανταποκρίνεται στο μέγιστο ποσοστό εφαρμογής ενός προϊόντος προστασίας καλλιεργειών που συνιστάται στις οδηγίες χρήσεως και σε ομοιόμορφη ενσωμάτωση σε κατάλληλο βάθος στο έδαφος (π.χ. άνω στιβάδα εδάφους πάχους 10 cm ([1]). Για παράδειγμα, για χημικά που εφαρμόζονται στο φύλλωμα ή στο έδαφος χωρίς ενσωμάτωση, το κατάλληλο βάθος για τον υπολογισμό της ποσότητας χημικού που θα πρέπει να προστεθεί σε κάθε φιάλη είναι 2,5 cm. Στην περίπτωση χημικών ενσωματούμενων στο έδαφος, το κατάλληλο βάθος είναι το βάθος ενσωμάτωσης που προσδιορίζεται στις οδηγίες χρήσεως. Για χημικά εν γένει, το ποσοστό εφαρμογής θα πρέπει να εκτιμάται με βάση τον κυριότερο τρόπο εισόδου για παράδειγμα, όταν η σημαντικότερη οδός εισόδου στο έδαφος είναι μέσω λάσπης υπονόμων, το χημικό θα πρέπει να προστίθεται στη λάσπη σε συγκέντρωση που να αντικατοπτρίζει την αναμενόμενη συγκέντρωση στη λάσπη ενώ η ποσότητα της προστιθέμενης στο έδαφος λάσπης θα πρέπει να αντικατοπτρίζει το κανονικό φορτίο λάσπης των γεωργικών εδαφών. Εάν η συγκέντρωση αυτή δεν είναι αρκετά υψηλή για την ταυτοποίηση βασικών προϊόντων μετατροπής, μπορεί να είναι χρήσιμη η επώαση ξεχωριστών εδαφικών δειγμάτων με υψηλότερα ποσοστά, θα πρέπει όμως να αποφεύγονται υπερβολικά ποσοστά που επηρεάζουν τις λειτουργίες των μικροοργανισμών του εδάφους (βλ. 1.5 και 1.8.2).

Εναλλακτικώς, μπορεί να υποβληθεί σε κατεργασία με την ουσία δοκιμής και κάποια μεγαλύτερη ποσότητα (δηλ. 1 έως 2 kg) εδάφους, προσεκτικά αναμεμειγμένη σε κατάλληλο μηχάνημα μείξεως και κατόπιν να μεταφερθεί σε μικρές ποσότητες των 50 έως 200 g σε φιάλες επωάσεως (π.χ. με τη χρήση διαχωριστών δειγμάτων). Κατάλληλες μικρές ποσότητες (π.χ. 1 g) του υποβληθέντος σε κατεργασία εδάφους θα πρέπει να αναλύονται για τον έλεγχο της ομοιόμορφης κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας. Η διαδικασία αυτή προτιμάται επειδή παρέχει τη δυνατότητα πιο ομοιόμορφης κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας στο έδαφος.

Υπό τις ίδιες συνθήκες (αερόβιες) με εκείνες δειγμάτων υποβληθέντων σε κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία επωάζονται και μη κατεργασμένα εδαφικά δείγματα. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνται για μετρήσεις βιομάζας κατά τη διάρκεια και στο τέλος των μελετών.

Όταν η ουσία δοκιμής εφαρμόζεται στο έδαφος διαλελυμένη σε οργανικό ή οργανικούς διαλύτες, εδαφικά δείγματα επεξεργασμένα με την ίδια ποσότητα διαλύτη ή διαλυτών επωάζονται υπό τις αυτές συνθήκες (αερόβιες) με εκείνες των κατεργασμένων με την ουσία δοκιμής δειγμάτων. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνται για μετρήσεις βιομάζας στην αρχή, κατά τη διάρκεια και στο τέλος των μελετών για τον έλεγχο των επιδράσεων του ή των διαλυτών στη μικροβιακή βιομάζα.

Οι φιάλες που περιέχουν το κατεργασμένο έδαφος είτε τοποθετούνται στο σύστημα διελεύσεως ροής που περιγράφεται στο σχήμα 1, είτε κλείονται με τη στήλη απορρόφησης που εμφαίνεται στο σχήμα 2 (βλ. παράρτημα 3).

([1]) Υπολογισμός της αρχικής συγκέντρωσης στη βάση περιοχής χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha]\cdot 10^6[mg/kg]}{l[m]\cdot 10^4[m^2/ha]\cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = Αρχική συγκέντρωση στο έδαφος [mg.kg^{-1}]
A = Ποσοστό εφαρμογής [kg.ha^{-1}]; l = πάχος εδαφικής στιβάδος τόπου [m]; α = ξηρά φαινόμενη πυκνότητα εδάφους [kg.m^{-3}].
Κατά κανόνα, ποσοστό εφαρμογής 1 kg.ha^{-1} οδηγεί σε συγκέντρωση εδάφους περίπου 1 mg.kg^{-1} σε στιβάδα 10 cm (για τιμή φαινόμενης πυκνότητας 1 g· cm^{-3}).

▼B

1.9.3 **Δειγματοληψία και μέτρηση**

Σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα, λαμβάνονται διπλές φιάλες επωάσεως και τα εδαφικά δείγματα εκχυλίζονται με κατάλληλους διαλύτες διαφορετικής πολικότητας και αναλύονται όσον αφορά την ουσία δοκιμής και/ή προϊόντα μετατροπής. Σε μια καλοσχεδιασμένη μελέτη, πρέπει να υπάρχει ικανός αριθμός φιαλών έτσι ώστε σε κάθε δειγματοληψία να αναλίσκονται δύο φιάλες. Επίσης, σε διάφορα χρονικά διαστήματα (ανά 7 ημέρες κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα και ανά 17 ημέρες μετά τον πρώτο μήνα), κατά τη διάρκεια και στο τέλος της επώασης κάθε εδαφικού δείγματος, λαμβάνονται απορροφητικά διαλύματα ή στερεά υλικά απορρόφησης και αναλύονται για πτητικά προϊόντα. Επιπλέον, θα πρέπει να περιλαμβάνεται και δείγμα εδάφους λαμβανόμενο απευθείας μετά την εφαρμογή (δείγμα ημέρας 0) από 5 τουλάχιστον πρόσθετα σημεία δειγματοληψίας. Τα χρονικά διαστήματα θα πρέπει να επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορεί να διαμορφώνεται πρότυπο μείωσης της ουσίας δοκιμής και πρότυπα σχηματισμού και απομάκρυνσης των προϊόντων μετατροπής (π.χ. 0, 1, 3, 7 ημέρες 2, 3 εβδομάδες 1, 2, 3 μήνες, κλπ.).

Όταν χρησιμοποιείται ουσία δοκιμής επισημασμένη με ^{14}C, θα προσδιορίζεται ποσοτικά με καύση η μη εκχυλίσιμη ραδιενέργεια και θα υπολογίζεται για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας ένα ισοζύγιο μάζας.

Στην περίπτωση αναερόβιας και επώασης υπό συνθήκες αναπτυσσόμενης όρυζας, η εδαφική και υδατική φάση αναλύονται μαζί για την ουσία δοκιμής και τα προϊόντα μετατροπής ή διαχωρίζονται με διήθηση ή φυγοκέντρηση πρίν από την εκχύλιση και ανάλυση.

1.9.4 **Προαιρετικές δοκιμές**

Αερόβιες, μη στείρες μελέτες σε διάφορες πρόσθετες θερμοκρασίες και με διάφορα ποσοστά υγρασίας εδάφους μπορεί να είναι χρήσιμες για την εκτίμηση της επίδρασης της θερμοκρασίας και της υγρασίας των εδαφών στους ρυθμούς μετατροπής μιας ουσίας δοκιμής και/ή των προϊόντων της μετατροπής στο έδαφος.

Μπορεί να επιχειρηθεί ένας πρόσθετος χαρακτηρισμός μη εκχυλίσιμης ραδιενέργειας χρησιμοποιώντας, π.χ, τη μέθοδο της υπέρ το κρίσιμο σημείο εκχύλισης ρευστού.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι ποσότητες της ουσίας δοκιμής, των προϊόντων μετατροπής, των πτητικών ουσιών (μόνον %) και των μη εκχυλισίμων θα πρέπει να δίδονται ως % της εφαρμοζόμενης αρχικής συγκέντρωσης και, όπου είναι σκόπιμο, ως $mg.kg^{-1}$ εδάφους (επί ξηρού βάρους) για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας. Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας θα πρέπει να δίδεται ως ποσοστό της εφαρμοζόμενης αρχικής συγκέντρωσης ένα ισοζύγιο μάζας. Μέσω γραφικής παράστασης των συγκεντρώσεων της ουσίας δοκιμής συναρτήσει του χρόνου μπορεί να γίνει εκτίμηση του χρόνου ημιζωής ή του DT_{50} στη μετατροπή. Βασικά προϊόντα μετατροπής θα πρέπει να ταυτοποιούνται και οι συγκεντρώσεις τους θα πρέπει να παρίστανται επίσης γραφικώς συναρτήσει του χρόνου για ανεύρεση των ρυθμών σχηματισμού και απομάκρυνσης. Βασικό προϊόν μετατροπής είναι κάθε προϊόν που αντιπροσωπεύει > 10 % της εφαρμοζόμενης δόσεως σε κάθε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Τα παγιδευόμενα πτητικά προϊόντα δίνουν μια ένδειξη του βαθμού πτητικότητας μιας ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής της από το έδαφος.

▼B

Με την εφαρμογή υπολογισμών στη βάση κατάλληλου μοντέλου κινητικής, θα πρέπει να λαμβάνονται ακριβέστεροι προσδιορισμοί τιμών χρόνου ημιζωής ή DT_{50} και, αν είναι σκόπιμο, DT_{75} και DT_{90}. Οι τιμές ημιζωής και DT_{50} θα πρέπει να αναφέρονται μαζί με την περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος μοντέλου, της τάξης κινητικής και του συντελεστή προσδιορισμού (r^2). Ευνοείται κινητική πρώτης τάξεως εκτός αν $\Gamma < 0.7$. Εάν είναι σκόπιμο, οι υπολογισμοί θα πρέπει να αφορούν και τα βασικά προϊόντα μετατροπής. Παραδείγματα κατάλληλων μοντέλων περιγράφονται στις παραπομπές 31 έως 35.

Στην περίπτωση μελετών ρυθμού σε διάφορες θερμοκρασίες, οι ρυθμοί μετατροπής θα πρέπει να περιγράφονται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας στην περιοχή των πειραματικών θερμοκρασιών χρησιμοποιώντας τη σχέση Arrhenius του τύπου:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ ή } \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

όπου ln A και B είναι σταθερές αναγωγής από την τομή και κλίση, αντίστοιχα, γραμμής άριστης εφαρμογής προερχόμενης από τη γραμμική αναγωγή του ln k συναρτήσει της 1/T, k είναι η σταθερά ρυθμού στη θερμοκρασία T και T είναι η θερμοκρασία σε Kelvin. Θα πρέπει να δίδεται προσοχή στο περιορισμένο εύρος θερμοκρασιών στο οποίο ισχύει η σχέση Arrhenius σε περίπτωση όπου η μετατροπή διέπεται από μικροβιακή δράση.

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αν και οι μελέτες διεξάγονται σε τεχνητό εργαστηριακό σύστημα, τα αποτελέσματα παρέχουν τη δυνατότητα εκτίμησης του ρυθμού μετατροπής της ουσίας δοκιμής και του ρυθμού σχηματισμού και απομάκρυνσης των προϊόντων μετατροπής υπό συνθήκες επιτόπιας εφαρμογής (36)(37).

Μελέτη της πορείας μετατροπής ουσίας δοκιμής παρέχει πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο η εφαρμοζόμενη ουσία υφίσταται δομικές μετατροπές στο έδαφος από χημικές και μικροβιακές αντιδράσεις.

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ**

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής:

Ουσία δοκιμής:

— συνήθης ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος (με υπόδειξη της θέσεως του ή των ιχνηθετών; όταν χρησιμοποιείται ραδιοεπισημασμένο υλικό) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ, ενότητα 1.5)

— καθαρότητα (προσμείξεις) της ουσίας δοκιμής

— ραδιοχημική καθαρότητα της επισημασμένης χημικής ουσίας και ειδική ενεργότητα (όπου αυτό κρίνεται απαραίτητο.

Ουσία αναφοράς:

— χημική ονομασία και δομή των ουσιών αναφοράς που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό ή/και την ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής

Εδάφη δοκιμής:

— στοιχεία για τον τόπο συλλογής,

— ημερομηνία και διαδικασία δειγματοληψίας του εδάφους,

▼B

— ιδιότητες των εδαφών, όπως pH, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, υφή (% άμμος, % ιλύς, % άργιλος), κατιοανταλλακτική ικανότητα, φαινόμενη πυκνότητα, χαρακτηριστικά κατακράτησης νερού και μικροβιακή βιομάζα,

— χρόνος αποθήκευσης και συνθήκες αποθήκευσης (αν προηγήθηκε αποθήκευση)

Συνθήκες δοκιμής:

— ημερομηνίες εκτέλεσης των μελετών,

— ποσότητα της ουσίας δοκιμής,

— χρησιμοποιηθέντες διαλύτες και μέθοδος εφαρμογής της ουσίας δοκιμής,

— βάρος αρχικώς υποβληθέντος σε κατεργασία εδάφους και του οποίου η δειγματοληψία γινόταν σε κάθε χρονική στιγμή για ανάλυση

— περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος συστήματος επώασης,

— ταχύτητες ροής αέρα (μόνο για συστήματα διέλευσης ροής)

— θερμοκρασία πειράματος,

— υγρασία εδάφους κατά την επώαση,

— μικροβιακή βιομάζα αρχικώς, κατά τη διάρκεια και στο τέλος των αερόβιων μελετών,

— pH, συγκέντρωση οξυγόνου και οξειδοαναγωνικό δυναμικό αρχικά, κατά τη διάρκεια και στο τέλος των αναερόβιων και υπό συνθήκες ορυζώνα μελετών,

— μέθοδος(οι) εκχύλισης,

— μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού και ταυτοποίησης της ουσίας δοκιμής και βασικών προϊόντων μετατροπής στο έδαφος και σε υλικά απορροφήσεως,

— αριθμός επαναληπτικών δειγμάτων και αριθμός μαρτύρων.

Αποτελέσματα:

— αποτέλεσμα προσδιορισμού μικροβιακής δραστικότητας,

— επαναληψιμότητα και ευαισθησία των χρησιμοποιουμένων αναλυτικών μεθόδων,

— ποσοστά ανάκτησης (τιμές % για μια έγκυρη μελέτη δίδονται στο 1.7.1),

— πίνακες αποτελεσμάτων εκφρασμένων ως % της αρχικά εφαρμοζόμενης δόσεως και, όπου κρίνεται σκόπιμο, ως $mg.kg^{-1}$ εδάφους (επί ξηρού βάρους),

— ισοζύγιο μάζας κατά τη διάρκεια και στο τέλος των μελετών,

— χαρακτηρισμός μη εκχυλίσιμης (δεσμευμένης) ραδιενέργειας ή υπολειμμάτων στο έδαφος,

— ποσοτικός προσδιορισμός απελευθερωθέντος $C0_2$ και άλλων πτητικών ενώσεων,

— γραφικές παραστάσεις συγκεντρώσεων στο έδαφος συναρτήσει του χρόνου για την ουσία δοκιμής και, όπου κρίνεται σκόπιμο, για βασικά προϊόντα μετατροπής,

— χρόνος ημιζωής ή DT_{50}, DT_{75} και DT_{90} για την ουσία δοκιμής και, όπου κρίνεται σκόπιμο, για βασικά προϊόντα μετατροπής, συμπεριλαμβανομένων και ορίων εμπιστοσύνης,

▼B

— εκτίμηση της ταχύτητας αβιοτικής αποικοδόμησης υπό στείρες συνθήκες,

— εκτίμηση της κινητικής μετατροπής για την ουσία δοκιμής και, όπου κρίνεται σκόπιμο, για βασικά προϊόντα μετατροπής,

— προτεινόμενες πορείες μετατροπής, όπου κρίνεται σκόπιμο,

— συζήτηση και ερμηνεία αποτελεσμάτων,

— μη επεξεργασμένα δεδομένα (δηλ. χρωματογραφήματα δειγμάτων, υπολογισμοί ρυθμών μετατροπής και μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση προϊόντων μετατροπής).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) European Union (EU) (Γ995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex HI, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie fur die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus. -

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (TUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Annex V to Dir. 67/548/EEC

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In «Environmental Dynamics of Pesticides». R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

Παραρτημα 1

ΤΑΣΗ ΝΕΡΟΥ, ΕΠΙΤΟΠΙΑ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (FC) ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΝΕΡΟΥ (WHC) ([1])

Ύψος στήλης ύδατος [cm]	pF ([α])	bar ([β])	Παρατηρήσεις
10^7	7	10^4	Ξηρό έδαφος
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Σημείο μαρασμού
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3.10^2$	2,5	0,33 ([γ])	Εύρος Επιτόπια ικανότητα ([δ])
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (κατά προσέγγιση)
1	0	0,001	Κορεσμένο υδατικώς έδαφος

([α]) pF = log της στήλης ύδατος σε cm.
([β]) 1 bar = 10^5 Pa.
([γ]) Αντιστοιχεί σε κατά προσέγγιση συγκέντρωση νερού 10 % σε άμμο, 35 % σε αργιλώδες έδαφος (loam) και 45 % σε άργιλο.
([δ]) Η επιτόπια ικανότητα δεν είναι σταθερή αλλά ποικίλει ανάλογα με τον τύπο του εδάφους μεταξύ pF 1,5 και 2,5.

Η τάση νερού μετριέται σε cm στήλης ύδατος ή σε bar. Λόγω του μεγάλου εύρους ρόφησης, η τάση εκφράζεται απλώς ως τιμή pF που ισοδυναμεί με το λογάριθμο της σε cm στήλης νερού.

Η επιτόπια ικανότητα ορίζεται ως η ποσότητα του νερού που μπορεί να αποθηκευτεί παρά τη βαρύτητα από ένα φυσικό έδαφος 2 ημέρες μετά από μεγαλύτερη περίοδο βροχόπτωσης ή μετά ικανή άρδευση. Προσδιορίζεται σε αδιατάρακτο έδαφος επί του πεδίου. Η μέτρηση δεν εφαρμόζεται συνεπώς σε εργαστηριακά δείγματα διαταραγμένου εδάφους. Οι προσδιοριζόμενες σε διαταραγμένα εδάφη τιμές FC μπορεί να εμφανίζουν μεγάλες συστηματικές διακυμάνσεις.

Η ικανότητα συγκράτησης νερού (WHC) προσδιορίζεται στο εργαστήριο με αδιατάρακτο και διαταραγμένο έδαφος με κορεσμό στήλης εδάφους από νερό μέσω τριχοειδικής μεταφοράς. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για διαταραγμένα εδάφη και μπορεί να είναι μέχρι 30 % μεγαλύτερη από την επιτόπια ικανότητα (1). Είναι επίσης ευκολότερο να προσδιοριστεί πειραματικώς σε σχέση με τον προσδιορισμό αξιόπιστων τιμών FC.

Σημειώσεις

([1]) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

Παραρτημα 2

ΥΓΡΑΣΙΕΣ (g νερού ανά 100 g ξηρού εδάφους) ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΥΠΩΝ ΕΔΑΦΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΧΩΡΕΣ

Τύπος εδάφους	Χώρα	Υγρασία εδάφους σε		
		WHC (1)	pF=1,8	pF = 2,5
Άμμος	Γερμανία	28,7	8,8	3,9
Αργ. άμμος (Loamy sand)	Γερμανία	50,4	17,9	12,1
Αργ. άμμος (Loamy sand)	Ελβετία	44,0	35,3	9,2
Λασπώδες (Silt loam)	Ελβετία	72,8	56,6	28,4
Αργ. άργιλος (Clay loam)	Βραζιλία	69,7	38,4	27,3
Αργ. άργιλος (Clay loam)	Ιαπωνία	74,4	57,8	31,4
Αμμώδης άργ. (Sandy loam)	Ιαπωνία	82,4	59,2	36,0
Λασπώδες (Silt loam)	ΗΠΑ	47,2	33,2	18,8
Αμμώδης άργ. (Sandy loam)	ΗΠΑ	40,4	25,2	13,3

(1) Ικανότητα συγκράτησης νερού.

▼B

Παραρτημα 3

Σχήμα 1

Παράδειγμα συσκευής διελεύσεως ροής για τη μελέτη της μετατροπής χημικών σε εδάφη ([1]) ([2])

1: βελονοειδής βαλβίδα

2: φιάλη με νερό για την έκπλυση αερίων

3: υπερμεμβράνη (στείρες συνθήκες μόνο), μέγεθος πόρων 0.2 μm

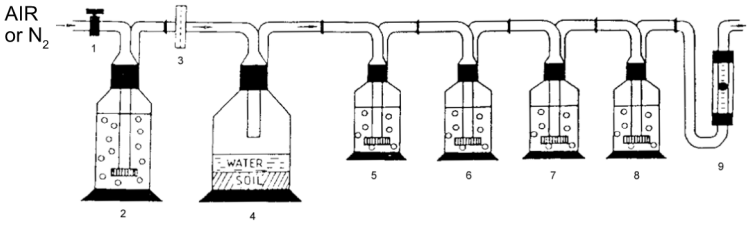
4: φιάλη μεταβολισμού εδάφους (με επικαλυπτική στιβάδα νερού μόνο για αναερόβιες και συνθήκες ορυζώνα)

5: παγίδα αιθυλενογλυκόλης για οργανικές πτητικές ενώσεις

6: παγίδα θειικού οξέος για αλκαλικές πτητικές ενώσεις

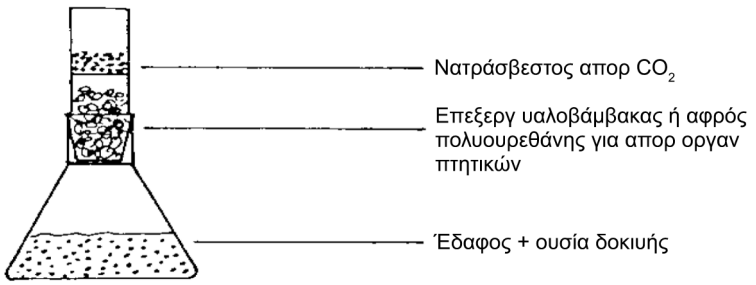
7, 8: παγίδα υδροξειδίου του νατρίου yiafor CO_2 & άλλα όξινα πτητικά

9: ροόμετρο



Σχήμα 2

Παράδειγμα βιομετρικής φιάλης για τη μελέτη της μετατροπής χημικών σε εδάφη ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

Γ.24. ΑΕΡΟΒΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΙΖΗΜΑΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμής είναι αναχαραγωή της OECD TG 308 (2002).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο χημικές ουσίες μπορούν να εισέλθουν σε ρήχά ή βαθέα ύδατα επιφανείας με διάφορους τρόπους όπως απ ευθείας εισαγωγή, παρασυρόμινες ως ψεκάδες, απορροή, αποστράγγιση, διάθεση αποβλήτων, μέοω βιομηχανικών, αστικών ή αγροτικών επροών και ατμοσφαιρική απόθεση. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμής περτγράφεται εργαστηριακή μέθοδος εκαμήσεως της αεδβιας και αναερόβιας μετατροπής οργανικών χημικών ουσιών σε υδατικά, ιζηματικά συστήματα, βασιζεται σε υπάρχουατς καιτυθυντήριες οδηγίες (1)(2)(3)(4)(5)-(6).Σς συνάντηση ανταλλαγής απόψεων του ΟΟΣΑ σχετικά με την επιλσγή εδαρών/ιζημάτων, η οποία έλαβε χώρα στην Belgirale στην Ιταλία το 1995 επήλθε συμφωία ειδικότερα, για τον αριθμό και τύπο των προς χρήση υζημάτων στην παρούσα δοκιμή. Διαορφώθηκαν επίσης συστάσεις σχετικά με τη συλλογή, χειριομό και αποθήκευση δειγμάτων ιζημάτων, βασιζδμενες σης οδηγίες ISO (8). Τέτοιου είδους μελέτες είναι απαραίτητες για χημικές ουσίες οι οποίες προστίθενται στο νερό ή που είναι πιθανόν να φθάσουν στο υδατικό περιβάλλον μέσω των οδών πον περιγράφιηκαν ανωτέρω.

Οι συνθήκες στα φυσικά, υδατικά ιζηματικά συστήματα είναι συγνά αερόβιες στην άνω υδατική φάση. Η επιφανειακή στιβάδα του ιζήματος μπορει να είναι είτε αερόβια είτε αναερόβια ενώ στο εοωτέρικό του ιζήματος οι συνθήκες είναι συνήθως αναερόβιες. Στο παρόν περιγράφονται τόσο αερόβιες, όσο και αναερόβιες δοκιμές, ώστε να σομπεριληφθούν όλες αυτέ οι πιθανότητες. Η αερόβιος δοκιμή αποτελεί προσομοίωση αερόβιας υδατικής στήλης κάνω από αερόβια ιζηματική στιβάδα, κάτω από την οποία βρίσκεται αναερόβια βαθμίβα. Η αναερόβια δοκιμή από αερόβια ιζηματική σηβάδα, κάτω από την οποία βρίσκεται αναερόβια βαθμίδα. Η αναερόβια δοκιμή αποτελει προσομοίωση πλήρως αναερόβιου συστήματός νερού-ιζήματος. Αν, λόγω περιστάσεων, πρέπει να υπάρξουν σημαντικές αποκλισεις από αυίες ης συστάσεις, π.χ. λόγω χσήσεως αθικτων ιζηματικων πυρήνων που μπορεί να έχουν εκτεθει στην οτην ουσία της δσκιμής, υπάρχουν για αυτό του σκοπό αλλες διαθέσιμες μεθοδοι (9).

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Σε κάθε περίπιωση θα πρέπει να χρησιμοποιοίνται οι μονάδες του Διεθνούς Συστήματος (SI).

Ουεία δοκιμής: καθε ουσία, αρχετικά προιδντα μετατροκής.

Προϊόντα μεταροπής: δλες οι ουσίες που προκίπουν από αναδράσδις βιοτικής ή αβιοπκής μετατροπής της ουσίας δοκιμής συμπεριλαμβανομένου του CO_2 και δεσμευμένων υπαλειμμάτων.

Δτσμετμένα απολείμματα: Ως«δεσμευμένα υπολείμματα» χαρακτηρίζονται ενώαεις οτο εδαφος οε φυτά ή οε ζώα, οι οποίες παραμένουν οτο υπόσιρωμα με τη μορφή της αρχικής ουσίας ή μεταβολιτών της μετά τις εκχυλίσεις. Η μέθοδος εκχυλίσεως δεν πρέπει να μεταβάλλει ουσιαδτικώφ αυτές καθ αυτές τις ενώσεις ή τη δομή του υποστρώματος. Η φύση του δεσμού μπορει να προσδιοπιστεί εν μέρει με τη Βοήθεια μεθόδων εκχυλίσεως που μεταβάλλουν το υπόστρωμα και εζειδικευμένες αναλωιικές τεχνικές. Μέχρι σήμερα, για παράδειγμα, έχουν ταυτοποιηθεί με τον τρόπο αυτό ομοιοπολικοί, ιονικοί και προφητικοί δεαμοι, λυθώς επίσης και παγιδεύαεις. Γενικά, ο σχημαπομός δεσμευμένων, υπαλειμμάτων μειώει σημανπκώς τη Βισπροαβασιμότητα και βιοδιαθτσιμότητα (10) [τροποποίηση από IUPAC 1984 (11)].

▼B

Αερόβια μετατροπή: (οξειδωτική): ανπδράσεις που λαμβάνουν χώρα παρονσία μοριακού οξυγόνου (12).

Αναερόβια μετατροπή: (αναγωγική): ανπδράσεις που λαμβάνουν χώρα παρονσία μοριακού οξυγόνου (12).

Φυσικά ύδατα: επιφανειακά ύδατα από λίμνες ποταμούς, ρέματα, κλπ.

Ίξημα: μίγμα ανοργάνων και οργανιπών χημικών συσιατικών, εκ των οπσιων τα οργανικά συσιαπκά περιέχουν ευώσεις με υψηλή περιεπτικότητα σε άνθρακα και άζωρο, ενώ ταυιχρόνως διαθέτουν και υψηλή μοριακή μάζα. Αποτιθεται από φυσικά ύδατα και σχηματίζει επιφάνεια επαφής (διεπαφή) με τα εν λόγω ύδατα.

Ανοργανοποίηση: η πλήρης αποικοδόμηση μιας οργανικής ενώσεως σε CO_2, H_20 υπό αερόβιες συνθήκες και CH4, $C0_2$ και H_20 υπό αναερόβιες συνθήκες. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμής, όταν χρησιμοποιείται ραδιενεργώς επισημασμένη ένωση, ως ανοργανοποίηση ορίζεται η εκτεταμένη αποικοδόμηση ενός μορίου, κατά την οποία επισημασμένο άτομο άνθρακα οξειδώνεται ή ανάγεται ποσοτικώς με απελευθέρωση αντίστοιχης ποσότητας $^{14}CO_2$ ή $^{14}CH_4$.

Χρόνος ημιζωής, $t_{0,5}$, είναι ο χρόνος που απαιτείται για την κατά 50 % μετατροπή της ουσίας δοκιμής, όταν η κινητική της αντιδράσεως μετατροπής είναι πρώτης τάξεως είναι ανεξάρτητη της αρχικής συγκέντρωσης.

DT_{50} (Χρόνος μειώσεως 50): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η αρχική συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 50 %.

DT_{75} (Χρόνος μειώσεως 75): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η αρχική συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 75 %.

DT_{90} (Χρόνος μειώσεως 90): είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο η αρχική συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής μειώνεται κατά 90 %.

1.3 ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για την ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων μετατροπής με τη βοήθεια φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών μεθόδων, πρέπει να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς.

1.4 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΥΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για τη μέτρηση της ταχύτητας μετατροπής μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε μη επισημασμένη, είτε επισημασμένη με ισότοπα ουσία δοκιμής. Ωστόσο, προτιμάται η επισημασμένη με ισότοπα ουσία. Η επισημασμένη ουσία είναι απαραίτητη για τη μελέτη της πορείας μετατροπής και τον προσδιορισμό του ισοζυγίου μάζας. Συνιστάται η επισήμανση με ^{14}C, ωστόσο μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη και η χρήση άλλων ισοτόπων όπως ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Η επισήμανση θα πρέπει να γίνεται στο σταθερότερο ή σταθερότερα μέρη του μορίου ([1]), όσο αυτό είναι δυνατόν. Η χημική ή/και ραδιοχημική καθαρότητα της ουσίας δοκιμής πρέπει να είναι τουλάχιστον 95 %.

Πριν από τη διεξαγωγή μιας δοκιμής, θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα τα ακόλουθα στοιχεία σχετικά με την ουσία δοκιμής:

(α) διαλυτότητα σε νερό (Μέθοδος Α.6)

(β) διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες

(γ) τάση ατμών (Μέθοδος Α.4) και η σταθερά του νόμου του Henry

([1]) Για παράδειγμα, αν η ουσία περιέχει έναν δακτύλιο, απαιτείται επισήμανση στον δακτύλιο αυτό αν η ουσία δοκιμής περιέχει δύο ή περισσοτέρους δακτυλίους, ίσως χρειαστεί η διεξαγωγή ξεχωριστών μελετών για την αξιολόγηση της τύχης κάθε επισημασμένου δακτυλίου και για τη λήψη καταλλήλων πληροφοριών για το σχηματισμό προϊόντων μετατροπής.

▼B

(δ) συντελεστής κατανομής σε n-οκτανόλη/νερό (Μέθοδος A.8)

(ε) σταθερά προσροφήσεως (K_d, K_f ή K_{oc}, ανάλογα με την περίπτωση) (Μέθοδος C. 18)

(στ) υδρόλυση (Μέθοδος C.7)

(ζ) σταθερά διαστάσεως (pK_a) [Οδηγία ΟΟΣΑ 112] (13)

(η) χημική δομή της ουσίας δοκιμής και θέση του ή των ισοτόπων επισημάνσεως, εφόσον υπάρχουν.

Σημείωση: Πρέπει να αναφέρεται η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκαν οι εν λόγων μετρήσεις.

Άλλες χρήσιμες πληροφορίες μπορεί να είναι δεδομένα για την τοξικότητα της ουσίας δοκιμής στους μικροοργανισμούς, δεδομένα σχετικά με την άμεση ή/και εγγενή βιοαποικοδομησιμότητα και δεδομένα αερόβιας και αναερόβιας μετατροπής στο έδαφος.

Θα πρέπει επίσης να υπάρχουν διαθέσιμες αναλυτικές μέθοδοι (συμπεριλαμβανομένων και μεθόδων εκχυλίσεως και καθαρισμού) για την ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής της στο νερό και στα ιζήματα (βλ. παράγραφο 1.7.2).

1.5 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στην περιγραφόμενη στην παρούσα δοκιμή μέθοδο χρησιμοποιείται αερόβιο και αναερόβιο υδατικό ιζηματικό σύστημα (βλ. παράρτημα 1), το οποίο παρέχει τη δυνατότητα:

i) μετρήσεως της ταχύτητας μετατροπής της ουσίας δοκιμής σε υδατικό ιζηματικό σύστημα,

ii) μετρήσεως της ταχύτητας μετατροπής της ουσίας δοκιμής στο ίζημα,

iii) μετρήσεως της ταχύτητας ανοργανοποιήσεως της ουσίας δοκιμής ή/και των προϊόντων μετατροπής της (όταν χρησιμοποιείται ουσία δοκιμής επισημασμένη με ^{14}C),

iv) ταυτοποιήσεως και ποσοτικού προσδιορισμού των προϊόντων μετατροπής στην υδατική και ιζηματική φάση, συμπεριλαμβανομένου και του ισοζυγίου μάζας (όταν χρησιμοποιείται επισημασμένη ουσία),

v) μετρήσεως της κατανομής της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής της μεταξύ των δύο φάσεων, κατά τη διάρκεια περιόδου επωάσεως στο σκοτάδι (για την αποφυγή π.χ. υπερβολικής αύξησης αλγών) σε σταθερή θερμοκρασία. Οι τιμές του χρόνου ημιζωής, DT_{50}, DT_{75} και DT_{90} προσδιορίζονται όπου το δικαιολογούν τα δεδομένα, δεν θα πρέπει όμως να χρησιμοποιούνται στην εξαγωγή συμπερασμάτων για χρονικές περιόδους, οι οποίες απέχουν πολύ από το χρονικό διάστημα διεξαγωγής του πειράματος (βλέπε παράγραφο 1.2).

Τόσο για την αερόβια όσο και για την αναερόβια μελέτη είναι απαραίτητα τουλάχιστον δύο ιζήματα και τα αντίστοιχα ύδατά τους (7). Ωστόσο, μπορεί να υπάρξουν περιπτώσεις όπου να πρέπει να χρησιμοποιηθούν περισσότερα από δύο υδατικά ιζήματα, παραδείγματος χάριν για μια χημική ουσία που μπορεί να εμφανίζεται σε περιβάλλον τόσο γλυκού, όσο και θαλασσίου ύδατος.

▼B

1.6 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η μέθοδος εφαρμόζεται γενικά σε χημικές ουσίες (επισημασμένες ή μη) για τις οποίες υπάρχει διαθέσιμη αναλυτική μέθοδος ικανοποιητικής ακριβείας και ευαισθησίας. Εφαρμόζεται σε μη πτητικές ενώσεις, ελαφρώς πτητικές ενώσεις, υδατοδιαλυτές ενώσεις ή και σε ενώσεις με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα. Η δοκιμή δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται σε ιδιαιτέρως πτητικές από το νερό χημικές ουσίες (π.χ. ατμίζουσες, οργανικοί διαλύτες), οι οποίες δεν μπορούν έτσι να διατηρηθούν στο νερό ή/και στο ίζημα υπό τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας δοκιμής.

Η μέθοδος εφαρμόζεται μέχρι στιγμής για τη μελέτη της μετατροπής χημικών ουσιών σε γλυκά ύδατα και ιζήματα, μπορεί όμως να εφαρμοσθεί κατ' αρχή και σε θαλάσσια συστήματα ή συστήματα υδάτων εκβολών ποταμών. Δεν είναι κατάλληλη για την προσομοίωση συνθηκών σε ρέοντα ύδατα (π.χ. ποταμοί) ή στην ανοιχτή θάλασσα.

1.7 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΟΣ

1.7.1 **Ανάκτηση**

Από την εκχύλιση και ανάλυση διπλών, τουλάχιστον, δειγμάτων ύδατος και ιζήματος αμέσως μετά την προσθήκη της ουσίας δοκιμής, προκύπτει μια πρώτη ένδειξη της επαναληψιμότητας της αναλυτικής μεθόδου και της ομοιομορφίας της διαδικασίας εφαρμογής για την ουσία δοκιμής. Οι τιμές ανάκτησης σε μεταγενέστερα στάδια των πειραμάτων προκύπτουν από τα αντίστοιχα ισοζύγια μάζας (όταν χρησιμοποιείται επισημασμένη ουσία). Τα ποσοστά ανάκτησης θα πρέπει να κυμαίνονται από 90 έως 110 % για επισημασμένες χημικές ουσίες (6) και από 70 έως 110 % για μη επισημασμένες χημικές ουσίες.

1.7.2 **Επαναληψιμότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου**

Η επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου (μη συμπεριλαμβανομένης της αποδοτικότητας της αρχικής εκχυλίσεως), όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής, μπορεί να ελεγχθεί με τη βοήθεια διπλής αναλύσεως του ίδιου εκχυλίσματος των δειγμάτων νερού ή ιζήματος, τα οποία έχουν επωαστεί για ικανό χρονικό διάστημα για το σχηματισμό προϊόντων μετατροπής.

Το όριο ανιχνεύσεως (LOD) της αναλυτικής μεθόδου για την ουσία δοκιμής και για τα προϊόντα μετατροπής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,01 $mg.kg^{-1}$ στο νερό ή στο ίζημα (ως ουσία δοκιμής) ή 1 % της αρχικής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο σύστημα δοκιμής, όποια τιμή από τις δύο είναι χαμηλότερη. Θα πρέπει επίσης να προσδιορίζεται και το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ).

1.7.3 **Ακρίβεια δεδομένων μετατροπής**

Από την ανάλυση αναγωγής των συγκεντρώσεων της ουσίας δοκιμής ως συνάρτησης του χρόνου, προκύπτουν τα σχετικά στοιχεία για την ακρίβεια της καμπύλης μετατροπής και είναι δυνατός ο υπολογισμός των ορίων εμπιστοσύνης για τους χρόνους ημιζωής (αν ισχύει κινητική ψευδο-πρώτης τάξως) ή τις τιμές DT_{50} και, όπου κρίνεται σκόπιμο, DT_{75} και DT_{90}.

1.8 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.8.1 **Σύστημα δοκιμής και εξοπλισμός**

Η μελέτη πρέπει να διεξάγεται σε υάλινους περιέκτες (π.χ. φιάλες, σωλήνες φυγοκεντρήσεως), εκτός και αν από προγενέστερα στοιχεία (όπως π.χ. σταθερά κατανομής σε n-οκτανόλη/νερό, δεδομένα ροφήσεως, κλπ.) προκύπτει ότι η ουσία δοκιμής μπορεί να κολλήσει στο γυαλί, οπότε και χρησιμοποιείται εναλλακτικό υλικό (π.χ. Teflon). Όταν είναι γνωστό ότι η ουσία δοκιμής κολλά στο γυαλί, το πρόβλημα μπορεί να επιλυθεί με χρήση μιας ή περισσοτέρων από τις ακόλουθες μεθόδους:

▼B

— προσδιορισμός της μάζας της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής της που ροφώνται στο γυαλί·

— διεξοδική έκπλυση με διαλύτη όλων των υάλινων σκευών μετά το πέρας της δοκιμής·

— χρήση τυποποιημένων από πλευράς συστάσεως προϊόντων (βλ. επίσης παράγραφο 1.9.2)·

— χρήση αυξημένης ποσότητας συνδιαλύτη για την προσθήκη της ουσίας δοκιμής στο σύστημα· αν χρησιμοποιείται συνδιαλύτης, θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να μην αντιδρά με την ουσία δοκιμής.

Παραδείγματα συνήθους εξοπλισμού δοκιμής, δηλ. συστημάτων διελεύσεως ροής και τύπου βιομέτρου, παρουσιάζονται στα παραρτήματα 2 και 3, αντιστοίχως (14). Άλλα χρήσιμα συστήματα επωάσεως περιγράφονται στη βιβλιογραφική αναφορά 15. Η σχεδίαση του πειραματικού εξοπλισμού θα πρέπει να είναι τέτοια που να επιτρέπει την ανταλλαγή αέρα ή αζώτου και την παγίδευση των πτητικών προϊόντων. Οι διαστάσεις του εξοπλισμού πρέπει να είναι τέτοιες ώστε να είναι συμβατές με τις απαιτήσεις της δοκιμής (βλέπε παράγραφο 1.9.1). Ο αερισμός μπορεί να γίνεται είτε με ήπια παραγωγή φυσαλίδων, είτε με διοχέτευση αέρα ή αζώτου πάνω από την επιφάνεια του ύδατος. Στην τελευταία περίπτωση, μπορεί να είναι σκόπιμη η ήπια ανάδευση του ύδατος από πάνω για καλύτερη διανομή του οξυγόνου ή του αζώτου σε αυτό. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται απηλλαγμένος $C0_2$ αέρας, καθώς αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αύξηση του pH του νερού. Ασχέτως περιπτώσεως, η διατάραξη του ιζήματος είναι ανεπιθύμητη και θα πρέπει κατά το δυνατόν να αποφεύγεται. Οι ελαφρώς πτητικές χημικές ουσίες θα πρέπει να δοκιμάζονται σε σύστημα τύπου βιομέτρου με ήπια ανάδευση της επιφανείας του ύδατος. Για την παγίδευση των πτητικών προϊόντων, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν κλειστά δοχεία με ατμοσφαιρικό αέρα ή άζωτο στο πάνω μέρος και εσωτερικά φιαλίδια (16). Κατά την αερόβια δοκιμή είναι απαραίτητη η τακτική ανανέωση του υπερκειμένου αερίου, ώστε να αντισταθμίζεται η κατανάλωση οξυγόνου από τη βιομάζα.

Στις κατάλληλες παγίδες για τη συλλογή πτητικών προϊόντων μετατροπής περιλαμβάνονται, χωρίς η παράθεση αυτή να είναι περιοριστική, διαλύματα υδροξειδίου του καλίου ή υδροξειδίου του νατρίου 1 $mol.dm^{-3}$ για το διοξείδιο του άνθρακα ([1]) και αιθυλενογλυκόλης, αιθανολαμίνης ή παραφίνης 2 % σε ξυλόλιο για οργανικές ενώσεις. Τα πτητικά προϊόντα που σχηματίζονται υπό αναερόβιες συνθήκες, όπως μεθάνιο, μπορούν να συλλέγονται για παράδειγμα με μοριακά κόσκινα. Τα εν λόγω πτητικά προϊόντα μπορούν να καίγονται προς, π.χ., CO_2, με διοχέτευση του αερίου μέσα από σωλήνα χαλαζία πλήρη CuO σε θερμοκρασία 900 °C και παγίδευση του σχηματιζόμενου $C0_2$ σε απορροφητικό μέσο με άλκαλι (17).

Απαιτείται, επίσης, εργαστηριακός εξοπλισμός για τη χημική ανάλυση της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής (π.χ. αέρια υγρή χρωματογραφία (GLC), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (TLC), φασματοσκοπία μάζας (MS), αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GS-MS), υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS), πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) κλπ.), ενώ απαιτούνται, κατά περίπτωση, και συστήματα ανιχνεύσεως ραδιοεπισημασμένων ή μή χημικών ουσιών. Όταν χρησιμοποιείται ραδιοεπισημασμένη ουσία, απαιτείται επίσης υγρός απαριθμητής σπινθηρισμών και οξειδωτής δια καύσεως (για την καύση ιζηματικών δειγμάτων πριν από τον προσδιορισμό της ραδιενέργειας).

Απαιτείται και άλλος συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός για φυσικοχημικούς και βιολογικούς προσδιορισμούς (βλ. Πίνακα 1, παράγραφος 1.8.2.2), γυάλινα σκεύη, χημικές ουσίες και αντιδραστήρια, κατά περίπτωση.

([1]) Επειδή τα αλκαλικά αυτά διαλύματα απορροφήσεως απορροφούν και το διοξείδιο του άνθρακα που προέρχεται από τον αερισμό, καθώς και εκείνο που σχηματίζεται από την αναπνοή στα αερόβια πειράματα, πρέπει να αλλάζονται σε τακτά χρονικά διαστήματα για να αποφεύγεται ο κορεσμός τους και κατά συνέπεια η απώλεια της απορροφητικής τους ικανότητας.

▼B

1.8.2 **Επιλογή και αριθμός των υδατικών ιζημάτων**

Οι τοποθεσίες δειγματοληψίας πρέπει να επιλέγονται σύμφωνα με το σκοπό της δοκιμής στην εκάστοτε περίπτωση. Κατά την επιλογή τόπων δειγματοληψίας, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη το πιθανώς υπάρχον ιστορικό γεωργικών, βιομηχανικών ή αστικών εισροών στο υδροφόρο στρώμα και τις πηγές του νερού. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ιζήματα αν αυτά έχουν προηγουμένως επιμολυνθεί με την ουσία δοκιμής ή με δομικά της ανάλογα μέσα στα προηγούμενα 4 χρόνια.

1.8.2.1 *Επιλογή ιζήματος*

Για τις αερόβιες μελέτες χρησιμοποιούνται συνήθως δύο ιζήματα (7). Τα δύο επιλεγόμενα ιζήματα θα πρέπει να διαφέρουν στην περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και στην υφή. Το ένα ίζημα θα πρέπει να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (2,5-7,5 %) και λεπτή υφή ενώ το άλλο θα πρέπει να έχει χαμηλή περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα (0,5-2,5 %) και τραχεία υφή. Η διαφορά μεταξύ περιεκτικοτήτων σε οργανικό άνθρακα θα πρέπει κανονικά να είναι τουλάχιστον 2 %. «Λεπτή υφή» θεωρείται όταν η περιεκτικότητα σε [άργιλο + ιλύ] ([1]) είναι μεγαλύτερη του 50 %, ενώ «τραχεία δομή» όταν η περιεκτικότητα σε [άργιλο + ιλύ] είναι μικρότερη του 50 %. Η διαφορά μεταξύ περιεκτικοτήτων σε [άργιλο + ιλύ] των δύο ιζημάτων πρέπει κανονικά να είναι τουλάχιστον 20 %. Στις περιπτώσεις όπου μια χημική ουσία είναι δυνατόν να φθάσει και σε θαλάσσια ύδατα, τουλάχιστον ένα εκ των συστημάτων νερού-ιζήματος θα πρέπει να προέρχεται από τη θάλασσα.

Για την αυστηρώς αναερόβια μελέτη, θα πρέπει να γίνεται δειγματοληψία δύο ιζημάτων (συμπεριλαμβανομένων και των αντιστοίχων υδάτων) από τις αναερόβιες ζώνες επιφανειακών υδάτων (7). Ο χειρισμός και μεταφορά της ιζηματικής και υδατικής φάσεως θα πρέπει να γίνεται προσεκτικά, απουσία οξυγόνου.

Υπάρχουν και άλλες παράμετροι που μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή των ιζημάτων και οι οποίες θα πρέπει να εξετάζονται κατά περίπτωση. Για παράδειγμα, το εύρος του pH των ιζημάτων παίζει σημαντικό ρόλο στη δοκιμή χημικών ουσιών η μετατροπή ή/και ρόφηση των οποίων μπορεί να εξαρτάται από το pH. Η εξάρτηση της ροφήσεως από το pH μπορεί να αντικατοπτρίζεται από την pK_a της ουσίας δοκιμής.

1.8.2.2 *Χαρακτηρισμός δειγμάτων νερού — ιζήματος*

Στον πίνακα που ακολουθεί, παρατίθενται καίριες παράμετροι που πρέπει να μετρούνται και να αναφέρονται (σχετικώς με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο) τόσο για το νερό, όσο και για το ίζημα, καθώς και το στάδιο της δοκιμής κατά το οποίο πρέπει οι παράμετροι αυτοί να προσδιορίζονται. Μέθοδοι προσδιορισμού των εν λόγω παραμέτρων μπορεί κανείς να βρεί στις βιβλιογραφικές αναφορές (18)(19)(20)(21).

Επιπροσθέτως, μπορεί κατά περίπτωση να είναι απαραίτητη η μέτρηση και αναφορά και άλλων παραμέτρων (π.χ. για γλυκά ύδατα: σωματίδια, αλκαλικότητα, σκληρότητα, αγωγιμότητα, NO_3/PO_4 (λόγος συγκεντρώσεων και επιμέρους τιμές) για ιζήματα: κατιοανταλλακτική ικανότητα, ικανότητα κατακράτησης ύδατος, ανθρακικά, ολικό άζωτο και φωσφόρος και για θαλάσσια συστήματα: αλατότητα). Η ανάλυση ιζημάτων και υδάτων για νιτρικά, θειϊκά, βιοδιαθέσιμο σίδηρο και πιθανώς και άλλους υποδοχείς ηλεκτρονίων, μπορεί να αποδειχθεί επίσης χρήσιμη, στον προσδιορισμό οξειδοαναγωγικών συνθηκών, ιδιαιτέρως όσον αφορά την αναερόβια μετατροπή.

([1]) [Άργιλος + ιλύς] είναι το ανόργανο κλάσμα του ιζήματος με μέγεθος σωματιδίων μικρότερο από 50 μm.

▼B

Μέτρηση παραμέτρων για το χαρακτηρισμό.δειγμάτων νερού-ιζήματος (7)(22)(23)

Παράμετρος	Στάδιο διαδικασίας δοκιμής					
	Τόπος δειγματοληψίας	Χειρισμός μετά τη δειγματοληψία	Ι Έναρξη έγκλιματισμού	Έναρξη της δοκιμής	Κατά τη διάρκεια της δοκιμής	Τέλος δοκιμής
Ύδωρ						
Πηγή/προέλευση	x					
Θερμοκρασία	x					
PH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Συγκέντρωση 0_2*	x		x	x	x	x
Δυναμικό οξειδοαναγωγής*			x	x	x	x
Ίζημα						
Πηγή/προέλευση	x					
Βάθος στιβάδας	x					
PH		x	x	x	x	x
Κατανομή μεγέθους σωματιδίων		x				
TOC		x	x	x		x
Μικροβιακή Ι βιομάζα (*)		x		x		x
Δυναμικό οξειδοαναγωγής (**)	Παρατήρηση (χρώμα/οσμή)		x	x	x	x

(*) Από πρόσφατα αποτελέσματα ερευνών προέκυψε ότι οι τιμές των μετρήσεων συγκεντρώσεως οξυγόνου στο νερό και των δυναμικών οξειδοαναγωγής δεν έχουν ούτε μηχανιστική ούτε προβλεπτική αξία όσον αφορά την αύξηση και ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών σε επιφανειακά ύδατα. (24)(25). Ο προσδιορισμός του βιοχημικώς απαιτουμένου οξυγόνου (BOD, κατά τη δειγματοληψία, την έναρξη και τη λήξη της δοκιμής) και των συγκεντρώσεων μικρο/μακρο θρεπτικών στοιχείων Ca, Mg και Mn (κατά την έναρξη και τη λήξη της δοκιμής) στο νερό και η μέτρηση του συνολικού N και συνολικού P στα ιζήματα (κατά τη δειγματοληψία και τη λήξη της δοκιμής) μπορεί να αποτελούν καλύτερα εργαλεία ερμηνείας και αξιολογήσεως της ταχύτητας και των οδών της αεροβίου βιομετατροπής.

(**) Μέθοδος ταχύτητας μικροβιακής αναπνοής (26), μέθοδος καπνισμού (27) ή μετρήσεις αποικιών σε τρυβλίο (π.χ. βακτήρια, ακτινομήκυτες, μήκυτες και συνολικές αποικίες) για αερόβιες μελέτες ταχύτητα μεθανογενέσεως για αναερόβιες μελέτες.

1.8.3 **Συλλογή, χειρισμός και αποθήκευση**

1.8.3.1 *Συλλογή*

Για τη δειγματοληψία ιζημάτων θα πρέπει να χρησιμοποιείται το σχέδιο της κατευθυντήριας οδηγίας ISO για τη δειγματοληψία ιζημάτων του πυθμένα (8). Τα δείγματα ιζήματος θα πρέπει να λαμβάνονται από την όλη πάχους 5-10 cm άνω ιζηματική στιβάδα. Εκτός του ιζήματος, από την ίδια τοποθεσία ή σημείο και κατά τον ίδιο χρόνο θα πρέπει να συλλέγονται δείγματα του σχετικού με το ίζημα ύδατος. Για την αναερόβια μελέτη, η δειγματοληψία και η μεταφορά των ιζημάτων και αντιστοίχων υδάτων πρέπει να γίνεται απουσία οξυγόνου (28)(βλέπε παράγραφο 1.8.2.1). Στη βιβλιογραφία περιγράφονται μερικές συσκευές δειγματοληψίας (8)(23).

▼B

1.8.3.2 *Χειρισμός*

Το ίζημα διαχωρίζεται με διήθηση από τα ύδατα και διέρχεται σε υγρή κατάσταση από κόσκινο 2 mm με τη βοήθεια περίσσειας ύδατος της αντιστοίχου τοποθεσίας, το οποίο στη συνέχεια απορρίπτεται. Εν συνεχεία αναμιγνύονται γνωστές ποσότητες ιζήματος και ύδατος στην επιθυμητή αναλογία (βλ. παράγραφο 1.9.1) σε φιάλες επωάσεως και προετοιμάζονται για την περίοδο εγκλιματισμού (βλ. παράγραφο 1.8.4). Στην περίπτωση της αναεροβίου μελέτης, όλα τα στάδια του χειρισμού πρέπει να διεξάγονται απουσία οξυγόνου (29)-(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3 *Αποθήκευση*

Συνιστάται έντονα η χρήση δειγμάτων ιζήματος και ύδατος που έχουν συλλεγεί πρόσφατα, αν ωστόσο είναι απαραίτητη η αποθήκευση, τότε ίζημα και νερό θα πρέπει να διέρχονται από κόσκινο ως περιγράφεται ανωτέρω και να αποθηκεύονται μαζί, υπό κατάκλυση με νερό (υδατική στιβάδα πάχους 6-10 cm), στο σκοτάδι, στους 4 ± 2 °C[4] για χρονικό διάστημα το πολύ μέχρι 4 εβδομάδες (7)(8)-(23). Τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν για αερόβια μελέτη θα πρέπει να αποθηκεύονται έτσι ώστε να επιτρέπεται η ελεύθερη δίοδος του αέρα (π.χ. σε ανοιχτούς περιέκτες), ενώ τα αντίστοιχα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν για αναερόβια μελέτη, πρέπει να αποθηκεύονται απουσία οξυγόνου. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και αποθηκεύσεως των δειγμάτων, δεν πρέπει τα δείγματα ιζήματος και νερού να καταψύχονται και το ίζημα να ξηραίνεται.

1.8.4 **Προετοιμασία των δειγμάτων ιζήματος/ύδατος για τη δοκιμή**

Πριν από την προσθήκη της ουσίας δοκιμής, πρέπει να προηγείται μια περίοδος εγκλιματισμού, όπου κάθε δείγμα ιζήματος/ύδατος τοποθετείται στο δοχείο επωάσεως που θα χρησιμοποιηθεί στην κυρίως δοκιμή και ο εγκλιματισμός πραγματοποιείται υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες όπως και στην επώαση (βλ. παράγραφο 1.9.1). Η περίοδος εγκλιματισμού είναι ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη λογικής σταθερότητας στο σύστημα, όσον αφορά το pH, τη συγκέντρωση οξυγόνου στο νερό, το δυναμικό οξειδοαναγωγής του ύδατος και του ιζήματος και το μακροσκοπικό διαχωρισμό των φάσεων. Η περίοδος εγκλιματισμού διαρκεί κανονικά από μια έως δύο εβδομάδες και δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις τέσσερις εβδομάδες. Αποτελέσματα προσδιορισμών που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια της εν λόγω περιόδου πρέπει να αναφέρονται.

1.9 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.9.1 **Συνθήκες δοκιμής**

Η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται στη συσκευή επωάσεως (βλ παράγραφο 1.8.1) με λόγο όγκων ύδατος/ιζήματος μεταξύ 3:1 και 4:1 και πάχος στιβάδας ιζήματος 2,5 cm (± ± 0,5 cm) ([1]) Η ελάχιστη ποσότητα ιζήματος (σε ξηρή κατάσταση) που συνιστάται για κάθε δοχείο επωάσεως είναι τα 50 γρ.

Η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται στο σκοτάδι υπό σταθερή θερμοκρασία στην περιοχή από 10 έως 30 °C. Ενδείκνυται θερμοκρασία της τάξεως των (20 ± 2) °C. Εφόσον κριθεί σκόπιμο, μπορεί να εξεταστεί κατά περίπτωση και μια πρόσθετη χαμηλότερη θερμοκρασία (π.χ. 10 C), ανάλογα με τις πληροφορίες που απαιτούνται από τη δοκιμή. Η θερμοκρασία επωάσεως θα πρέπει να παρακολουθείται και να αναφέρεται στην έκθεση.

([1]) Από πρόσφατες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η αποθήκευση στους 4 °C μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα του ιζήματος, με πιθανή συνέπεια ελάττωση της μικροβιακής δράσεως (34).

▼B

1.9.2 **Επεξεργασία και εφαρμογή της ουσίας δοκιμής**

Χρησιμοποιείται μία συγκέντρωση δοκιμής της χημικής ουσίας ([1]). Για χημικές ουσίες προστασίας καλλιεργειών που χρησιμοποιούνται απ' ευθείας σε υδάτινα περιβάλλοντα, ως μέγιστο ποσοστό εφαρμογής θα πρέπει να λαμβάνεται η μέγιστη δόση που αναφέρεται στην ετικέτα, υπολογιζόμενο βάσει του εμβαδού της επιφανείας του ύδατος στο δοχείο δοκιμής. Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις, η προς χρήση συγκέντρωση θα πρέπει να βασίζεται σε προβλέψεις από περιβαλλοντικές εκπομπές. Πρέπει επίσης να λαμβάνεται μέριμνα, ώστε να διασφαλίζεται η εφαρμογή μιας ενδεδειγμένης συγκέντρωσης της ουσίας δοκιμής, που να χαρακτηρίζει την οδό μετατροπής και τον σχηματισμό και αποσύνθεση των προϊόντων μετατροπής. Μπορεί να είναι αναγκαία η χρήση μεγαλυτέρων δόσεων (π.χ. 10 φορές) σε περιπτώσεις όπου οι συγκεντρώσεις της ουσίας δοκιμής είναι πολύ κοντά στα όρια ανιχνεύσεως κατά την έναρξη της μελέτης ή/και όπου βασικά προϊόντα μετατροπής δεν μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα όταν είναι παρόντα σε ποσοστό 10 % του ποσοστού εφαρμογής της ουσίας δοκιμής. Ωστόσο αν χρησιμοποιηθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις δοκιμής, αυτό δεν θα πρέπει να επιδρά αρνητικά στη μικροβιακή δραστικότητα του συστήματος νερό-ίζημα. Για να επιτευχθεί σταθερή συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής σε δοχεία με διαφορετικές διαστάσεις, μπορεί να κριθεί σκόπιμη κάποια προσαρμογή της ποσότητας της εφαρμοζόμενης ουσίας, με βάση το βάθος της υδάτινης στήλης στο δοχείο σε σχέση με το βάθος του ύδατος στην τοποθεσία δειγματοληψίας (που υποτίθεται ότι είναι 100 cm, μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν και άλλα βάθη). Για ένα παράδειγμα υπολογισμού, βλ. παράρτημα 4.

Θεωρητικώς, η ουσία δοκιμής θα πρέπει να εφαρμόζεται ως υδατικό διάλυμα στην υδατική φάση του συστήματος δοκιμής. Αν δεν μπορεί να γίνει διαφορετικά, επιτρέπεται η χρήση μικρή ποσοτήτων αναμίξιμων με το νερό διαλυτών (όπως ακετόνη, αιθανόλη) για την εφαρμογή και κατανομή της ουσίας δοκιμής, δεν πρέπει όμως να υπερβαίνουν το 1 % κ.ο. ενώ δεν πρέπει να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στη μικροβιακή δραστικότητα του συστήματος δοκιμής. Πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στη δημιουργία του υδατικού διαλύματος της ουσίας δοκιμής — για τη διασφάλιση πλήρους ομοιογένειας, μπορεί να είναι σκόπιμη η χρήση στηλών παραγωγής και προανάμειξη. Μετά την προσθήκη του υδατικού διαλύματος στο σύστημα δοκιμής, συνιστάται ήπια ανάδευση της υδατικής φάσεως, με την ελάχιστη δυνατή ανατάραξη του ιζήματος.

Η χρήση τυποποιημένων προϊόντων δεν συνιστάται συνήθως καθώς τα συστατικά του παρασκευάσματος μπορεί να επηρεάζουν την κατανομή της ουσίας δοκιμής ή/και των προϊόντων μετατροπής μεταξύ υδατικής και ιζηματικής φάσεως. Ωστόσο, για ουσίες δοκιμής με μικρή διαλυτότητα στο νερό, η χρήση τυποποιημένου υλικού μπορεί να αποτελέσει μια κατάλληλη εναλλακτική λύση.

Ο αριθμός των δοχείων επωάσεως εξαρτάται από τον αριθμό των χρόνων δειγματοληψίας (βλ. παράγραφο 1.9.3). Πρέπει να χρησιμοποιείται ικανός αριθμός συστημάτων δοκιμής, έτσι ώστε για κάθε χρόνο δειγματοληψίας να μπορούν να αναλίσκονται δύο συστήματα δοκιμής. Όπου χρησιμοποιούνται μονάδες ελέγχου του κάθε υδατικού ιζηματικού συστήματος, αυτές δεν θα πρέπει να έχουν κατεργαστεί με την ουσία δοκιμής. Οι μονάδες ελέγχου μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της μικροβιακής βιομάζας του ιζήματος και του συνολικού οργανικού άνθρακα του ύδατος και του ιζήματος κατά τη λήξη της μελέτης. Δύο από τις μονάδες ελέγχου (δηλ. μια μονάδα ελέγχου από κάθε υδατικό ίζημα) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση των απαιτουμένων παραμέτρων στο ίζημα και στο νερό κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού (βλ. πίνακα στην παράγραφο 1.8.2.2). Στην περίπτωση όπου η ουσία δοκιμής εφαρμόζεται με τη βοήθεια διαλύτη, πρέπει να περιλαμβάνονται δύο ακόμη μονάδες ελέγχου για την μέτρηση τυχόν δυσμενών επιδράσεων στη μικροβιακή δραστικότητα του συστήματος δοκιμής.

([1]) Η δοκιμή με δεύτερη συγκέντρωση μπορεί να είναι χρήσιμη για χημικές ουσίες που φθάνουν τα επιφανειακά ύδατα μέσω διαφορετικών οδών εισαγωγής, με αποτέλεσμα σημαντικώς διαφορετικές συγκεντρώσεις, εφ' όσον βέβαια η μικρότερη συγκέντρωση μπορεί να αναλυθεί με ικανοποιητική ακρίβεια.

▼B

1.9.3 **Διάρκεια δοκιμής και δειγματοληψία**

Η διάρκεια του πειράματος δεν θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει τις 100 ημέρες (6) και θα πρέπει να συνεχίζεται μέχρις ότου είτε να εξακριβωθεί η πορεία αποικοδομήσεως και ο τρόπος κατανομής ύδατος/ιζήματος, είτε να έχει αναλωθεί λόγω μετατροπής ή/και απομάκρυνσης λόγω πτητικότητας το 90 % της ουσίας δοκιμής. Ο αριθμός των χρόνων δειγματοληψίας πρέπει να είναι τουλάχιστον έξι (συμπεριλαμβανομένου και του χρόνου μηδέν), χρησιμοποιώντας ενδεχομένως για τον καθορισμό του ενδεδειγμένου καθεστώτος δειγματοληψίας και της διάρκειας της δοκιμής μια προαιρετική προκαταρκτική μελέτη (βλ. παράγραφο 1.9.4), εκτός και αν υπάρχουν διαθέσιμα επαρκή δεδομένα από προηγούμενες μελέτες. Για υδρόφοβες ουσίες δοκιμής, μπορεί να χρειάζονται πρόσθετα σημεία δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια της αρχικής περιόδου της μελέτης, προκειμένου να προσδιοριστεί ο λόγος κατανομής μεταξύ των φάσεων του νερού και του ιζήματος.

Σε κατάλληλα χρονικά σημεία δειγματοληψίας, ολόκληρα δοχεία επωάσεως (επαναληπτικά) απομακρύνονται προς ανάλυση. Το ίζημα και το υπερκείμενο νερό αναλύονται ξεχωριστά ([1]). Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να απομακρύνεται προσεκτικά, με την ελάχιστη δυνατή ανατάραξη του ιζήματος. Η εκχύλιση και ο χαρακτηρισμός της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής πρέπει να γίνονται με κατάλληλες αναλυτικές μεθόδους. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την απομάκρυνση τυχόν υλικού που μπορεί να έχει προσροφηθεί στο δοχείο επωάσεως ή σε σωληνώσεις διασύνδεσης που χρησιμοποιούνται για την . παγίδευση των πτητικών ουσιών.

1.9.4 **Προαιρετική προκαταρκτική δοκιμή**

Αν από άλλες σχετικές μελέτες δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί διάρκεια και καθεστώς δειγματοληψίας για την ουσία δοκιμής, μπορεί να κριθεί σκόπιμη η διεξαγωγή προαιρετικής προκαταρκτικής δοκιμής, η οποία θα πρέπει να διεξάγεται υπό τις ίδιες συνθήκες δοκιμής που προτείνονται για την οριστική μελέτη. Οι σχετικές πειραματικές συνθήκες και τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής δοκιμής, εφόσον γίνει, πρέπει να αναφέρονται εν συντομία στην έκθεση.

1.9.5 **Μετρήσεις και ανάλυση**

Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας στο νερό και το ίζημα, θα πρέπει να μετριέται και να αναφέρεται στην έκθεση η συγκέντρωση της ουσίας δοκιμής και των προϊόντων μετατροπής (ως συγκέντρωση και ως ποσοστό της εφαρμοζόμενης). Γενικά, προϊόντα μετατροπής που ανιχνεύονται ως ποσοστό άνω του 10 % της εφαρμοζομένης ραδιενέργειας στο σύνολο του συστήματος ύδατος-ιζήματος σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, θα πρέπει να ταυτοποιούνται, εκτός και αν υπάρχει λογική αιτιολόγηση περί του αντιθέτου. Προϊόντα μετατροπής των οποίων οι συγκεντρώσεις αυξάνονται συνεχώς κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα πρέπει και αυτά να λαμβάνονται υπ' όψη για ταυτοποίηση, ακόμη και αν οι συγκεντρώσεις τους δεν υπερβαίνουν τα ανωτέρω δοθέντα όρια, καθώς αυτό μπορεί να δείχνει την ύπαρξη ανθεκτικότητας. Τα θέματα αυτά πρέπει να εξετάζονται κατά περίπτωση και στην έκθεση να καταγράφονται οι αντίστοιχες αιτιολογίες.

Για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, θα πρέπει να αναφέρονται τα αποτελέσματα από τα συστήματα παγιδεύσεως αερίων/πτητικών ενώσεων ($C0_2$ και άλλα, δηλ. πτητικές οργανικές ενώσεις). Επίσης, θα πρέπει να αναφέρονται και τα ποσοστά ανοργανοποίησης. Τέλος, θα πρέπει να αναφέρονται για κάθε σημείο δειγματοληψίας τα μη εκχυλίσιμα (δεσμευμένα) υπολείμματα στο ίζημα.

([1]) Στις περιπτώσεις όπου μπορεί να συμβεί γρήγορη επανοξείδωση των προϊόντων αναεροβίου μετατροπής, οι αναερόβιες συνθήκες πρέπει να διατηρούνται κατά τη διάρκεια του δειγματοληψίας και της αναλύσεως.

▼B

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, πρέπει να υπολογίζεται το συνολικό ισοζύγιο μάζας ή ανάκτηση (βλ. παράγραφος 1.7.1) της προστεθείσας ραδιενέργειας. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται ως ποσοστό της προστεθείσας ραδιενέργειας. Για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, θα πρέπει επίσης να αναφέρεται η κατανομή της ραδιενέργειας μεταξύ νερού και ιζήματος ως συγκεντρώσεις και ποσοστά.

Πρέπει να υπολογίζονται ο χρόνος ημιζωής, ο DT_{50} και, αν χρειάζεται, οι DT_{75} και DT_{90} της ουσίας δοκιμής, μαζί με τα όρια εμπιστοσύνης τους (βλ. παράγραφος 1.7.3). Πληροφορίες για την ταχύτητα ανάλωσης της ουσίας δοκιμής στο νερό και το ίζημα μπορούν να ληφθούν με τη χρήση καταλλήλων εργαλείων εκτίμησης. Σε αυτά περιλαμβάνονται η εφαρμογή κινητικής αντιδράσεως ψευδοπρώτης τάξεως, εμπειρικές τεχνικές προσαρμογής καμπυλών, στις οποίες χρησιμοποιούνται γραφικές ή αριθμητικές λύσεις καθώς και περισσότερο περίπλοκες εκτιμήσεις που χρησιμοποιούν, για παράδειγμα, μοντέλα απλού ή πολλαπλών χώρων (compartment). Περισσότερες λεπτομέρειες μπορεί κανείς να βρεί στην αντίστοιχη δημοσιευμένη βιβλιογραφία (35)(36)(37).

Όλες οι προσεγγίσεις έχουν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους και διαφέρουν σημαντικά από πλευράς πολυπλοκότητας. Η υπόθεση της κινητικής πρώτης τάξεως μπορεί να θεωρηθεί ως υπεραπλούστευση των διαδικασιών αποικοδομήσεως και κατανομής, όμως όπου είναι δυνατή παρέχει έναν όρο (τη σταθερά ταχύτητας ή τον χρόνο ημιζωής), ο οποίος είναι εύκολα κατανοητός και με ιδιαίτερη αξία σε μοντέλα προσομοιώσεως και σε υπολογισμούς προβλεπομένων περιβαλλοντικών συγκεντρώσεων. Οι εμπειρικές προσεγγίσεις ή οι γραμμικοί μετασχηματισμοί μπορεί να οδηγήσουν σε καλύτερα αποτελέσματα από πλευράς προσαρμογής των καμπυλών στα δεδομένα και, κατά συνέπεια, δίνουν μια καλύτερη εκτίμηση του χρόνου ημιζωής, του DT_{50} και, αν χρειάζεται, των DT_{75} και DT_{90}. Η χρήση των παραγώγων σταθερών είναι, ωστόσο, περιορισμένη. Τα μοντέλα χώρου (compartment models) μπορούν να δημιουργήσουν μια σειρά από χρήσιμες σταθερές, σημαντικές στην αξιολόγηση του κινδύνου, που περιγράφουν την ταχύτητα αποικοδομήσεως στους διάφορους χώρους και την κατανομή της χημικής ουσίας. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση σταθερών ταχύτητας σχηματισμού και αποικοδομήσεως κυρίων προϊόντων μετατροπής. Σε όλες τις περιπτώσεις, η επιλεγόμενη μέθοδος πρέπει να αιτιολογείται και ο ερευνητής πρέπει να αποδεικνύει γραφικώς ή/και στατιστικώς την καταλληλότητα της προσαρμογής.

3. **ΑΝΑΦΟΡΑ**

3.1 ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ουσία δοκιμής:

— συνήθης ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος (με υπόδειξη της θέσεως του ή των ιχνηθετών, όταν χρησιμοποιείται ραδιοεπισημασμένο υλικό) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες

— καθαρότητα (προσμείξεις) της ουσίας δοκιμής

— ραδιοχημική καθαρότητα της επισημασμένης χημικής ουσίας και μοριακή ενεργότητα (όπου αυτό κρίνεται απαραίτητο).

▼B

Ουσίες αναφοράς:

— χημική ονομασία και δομή των ουσιών αναφοράς που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό ή/και την ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής

Δοκιμή ιζημάτων και υδάτων:

— θέση και περιγραφή της ή των τόπων δειγματοληψίας του υδατικού ιζήματος συμπεριλαμβανομένου, αν αυτό είναι δυνατό, και του ιστορικού τυχόν μολύνσεως·

— όλες οι πληροφορίες που σχετίζονται με τη συλλογή, αποθήκευση (αν χρειάστηκε) και εγκλιματισμό των συστημάτων ύδατος-ιζήματος·

— χαρακτηριστικά των δειγμάτων ύδατος-ιζήματος, όπως καθορίζονται στον πίνακα στην παράγραφο 1.8.2.2.

Συνθήκες δοκιμής:

— χρησιμοποιηθέν σύστημα δοκιμής (π.χ. διελεύσεως ροής, βιόμετρο, τρόπος αερισμού, μέθοδος αναδεύσεως, όγκος νερού,. μάζα ιζήματος, πάχος στιβάδας ύδατος και ιζήματος, διαστάσεις δοχείων δοκιμής κλπ.)

— εφαρμογή της ουσίας δοκιμής στο σύστημα δοκιμής: χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση δοκιμής, αριθμός επαναληπτικών δειγμάτων και μαρτύρων, τρόπος εφαρμογής της ουσίας δοκιμής (π.χ. τυχόν χρήση διαλύτη), κλπ.

— θερμοκρασία επωάσεως·

— χρόνοι δειγματοληψίας·

— μέθοδοι εκχυλίσεως και αποδόσεις, αναλυτικές μέθοδοι και όρια ανιχνεύσεως·

— μέθοδοι χαρακτηρισμού/ταυτοποιήσεως των προϊόντων μετατροπής·

— αποκλίσεις από το πρωτόκολλο ή τις συνθήκες δοκιμής κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Αποτελέσματα:

— ανεπεξέργαστα αριθμητικά δεδομένα αντιπροσωπευτικών αναλύσεων (όλα τα ανεπεξέργαστα δεδομένα πρέπει να φυλάσσονται στο αρχείο ΟΕΠ)

— επαναληψιμότητα και ευαισθησία των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών μεθόδων·

— Ποσοστά ανακτήσεως (% τιμές για μια έγκυρη μελέτη δίνονται στην παράγραφο 1.7.1)·

— πίνακες αποτελεσμάτων εκφραζομένων ως ποσοστό % της εφαρμοζόμενης δόσεως και σε $mg.kg^{-1}$ σε νερό, ίζημα και συνολικό σύστημα (μόνο %) για την ουσία δοκιμής και, αν κρίνεται απαραίτητο, για τα προϊόντα μετατροπής και τη μη εκχυλισθείσα ραδιενέργεια.·

— ισοζύγιο μάζας κατά τη διάρκεια και κατά τη λήξη των μελετών·

— γραφική αναπαράσταση της μετατροπής στα κλάσματα ύδατος και ιζήματος και στο όλο σύστημα (συμπεριλαμβανομένης και της ανοργανοποιήσεως)·

— Ποσοστά ανοργανοποιήσεως·

▼B

— χρόνος ημιζωής, DT_{50} και, αν είναι απαραίτητο, DT_{75} και DT_{90} για την ουσία δοκιμής και, όπου είναι απαραίτητο, για κύρια προϊόντα μετασχηματισμού, συμπεριλαμβανομένων και των ορίων εμπιστοσύνης στο νερό, ίζημα και σε όλο το σύστημα·

— εκτίμηση της κινητικής μετατροπής της ουσίας δοκιμής και, όπου είναι απαραίτητο, των κυρίων προϊόντων μετατροπής·

— προτιμώμενη οδός μετατροπής, όπου κρίνεται απαραίτητο·

— συζήτηση των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2..1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada, pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17^{th} edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, WJ. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues Π. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187 — 203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic "representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47 — 60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354:

▼B

Παραρτημα 1

ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΑ ΟΔΗΓΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΑΕΡΟΒΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Αερόβιο σύστημα δοκιμής

Το αερόβιο σύστημα δοκιμής που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο αποτελείται από μια αερόβια στιβάδα ύδατος (συνήθης συγκεντρώσεις οξυγόνου από 7 έως 10 $mg.l^{-1}$) και στιβάδα ιζήματος, αερόβια στην επιφάνεια και αναερόβια κάτω από την επιφάνεια (σύνηθες μέσο δυναμικό οξειδοαναγωγής (E_h) στην αναερόβια ζώνη του ιζήματος από - 80 έως - 190 mV). Υγρός αέρας διέρχεται πάνω από την επιφάνεια του νερού σε κάθε μονάδα επωάσεως για να διατηρηθεί επαρκής ποσότητα οξυγόνου στον υπερκείμενο χώρο.

Αναερόβιο σύστημα δοκιμής

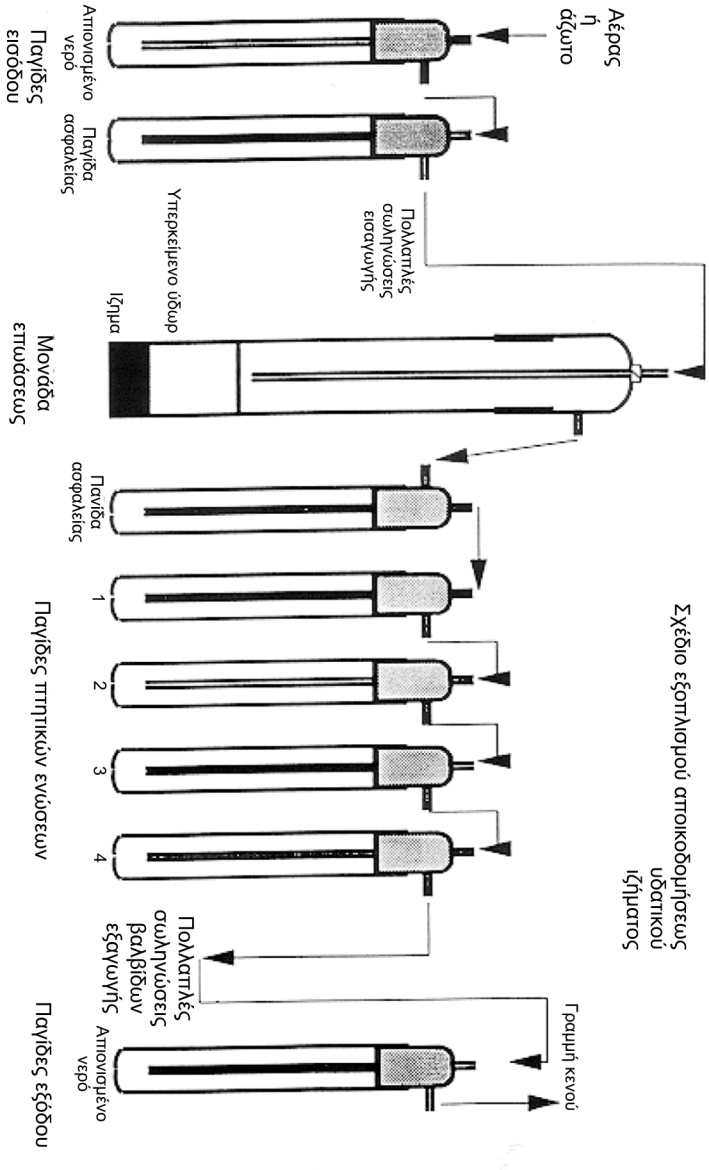
Για το αναερόβιο σύστημα δοκιμής η διαδικασία δοκιμής είναι ουσιαστικώς η ίδια με την περιγραφείσα στο αερόβιο σύστημα, εκτός του ότι πάνω από την επιφάνεια του νερού διοχετεύεται ένυγρο αέριο άζωτο, σε κάθε μονάδα επωάσεως, ώστε να διατηρείται υπερκείμενος χώρος πλήρης αζώτου. Το ίζημα και το νερό θεωρούνται ως αναερόβια εφόσον το δυναμικό οξειδοαναγωγής (E_h) είναι μικρότερο από -100 mV.

Στην αναερόβια δοκιμή, η εκτίμηση της ανοργανοποιήσεως συμπεριλαμβάνει και μέτρηση του εκλυόμενου διοξειδίου του άνθρακα και μεθανίου.

▼B

Παραρτημα 2

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΔΙΑΤΑΞΕΩΣ ΔΙΕΔΕΥΣΕΩΣ ΡΟΗΣ

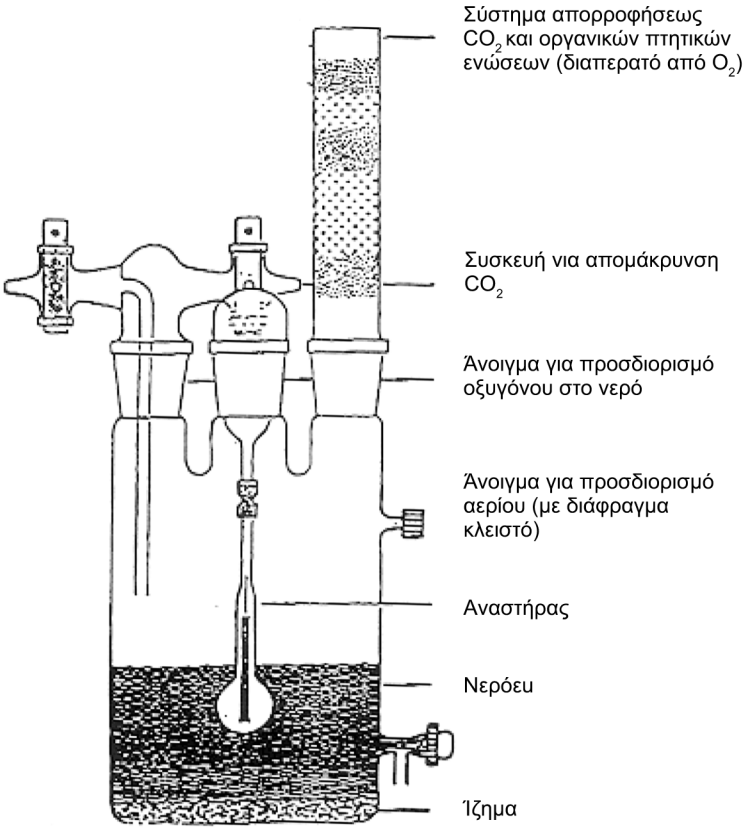


Παγίδα ασφαλείας άδεια
Παγίδα 1:
αιθυλενογλυκόλη για την παγίδευση πτητικών οργανικών ενώσεων
Παγίδα 2:
θειικό οξύ 0.1 M για την παγίδευση αλκαλικών πτητικών ενώσεων
Παγίδες 3 & 4:
υδροξείδιο του νατρίου 2M για την παγίδευση CO_2 και άλλων όξινων πτητικών ενώσεων

▼B

Παραρτημα 3

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΔΙΑΤΑΞΕΩΣ ΒΙΟΜΕΤΡΟΥ



▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΔΟΣΕΩΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΔΟΧΕΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εσωτερική διάμετρος κυλίνδρου:	= 8 cm
Βάθος στήλης ύδατος μη περιλαμβανομένου του ιζήματος:	= 12 cm
Εμβαδόν επιφανείας: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Ποσοστό εφαρμογής: 500 g ουσίας δοκιμής/ha αντιστοιχεί σε 5 μg/cm^2	
Σύνολο μg: $5 \times 50,3$	= 251,5 μg
Ρύθμιση ποσότητας σύμφωνα με βάθος 100 cm:	
$12 \times 251,5 \div 100$	= 30,18 μg
Όγκος στήλης ύδατος: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Συγκέντρωση στο νερό: $30,18 \div 603$	= 0,050 μg/ml ή 50 μg/l

▼M1

Γ.25. ΑΕΡΟΒΙΑ ΑΝΟΡΓΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ — ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 309 (2004) του ΟΟΣΑ (1)

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό της χρονικής πορείας της βιοαποικοδόμησης ελεγχόμενης ουσίας σε χαμηλή συγκέντρωση σε αερόβια φυσικά ύδατα και στην ποσοτικοποίηση των παρατηρήσεων υπό μορφή εκφράσεων κινητικής. Η προσομοιωτική αυτή δοκιμή είναι μια εργαστηριακή δοκιμή διαλείποντος έργου (ασυνεχής), με ανακινούμενες φιάλες, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταχύτητας της αερόβιας αποικοδόμησης οργανικών ουσιών σε δείγματα φυσικών επιφανειακών υδάτων (γλυκά, υφάλμυρα ή θαλάσσια). Βασίζεται στο πρότυπο ISO/DIS 14592-1 (2) και περιλαμβάνει επίσης στοιχεία από τις μεθόδους δοκιμής Γ.23 και Γ.24 (3)(4). Σε περίπτωση δοκιμής μεγάλης διάρκειας, η διαδικασία διαλείποντος έργου μπορεί να αντικατασταθεί από ημισυνεχή διαδικασία, ώστε να αποφευχθεί η αλλοίωση του μικροκόσμου της δοκιμής. Ο κύριος στόχος της προσομοιωτικής δοκιμής είναι ο προσδιορισμός της ανοργανοποίησης της ελεγχόμενης ουσίας στα επιφανειακά ύδατα, η δε ανοργανοποίηση χρησιμεύει ως βάση για την έκφραση της κινητικής της αποικοδόμησης. Η δοκιμή αυτή έχει ωστόσο και έναν δεύτερο, προαιρετικό στόχο, ο οποίος συνίσταται στην άντληση πληροφοριών σχετικά με την πρωταρχική αποικοδόμηση και τον σχηματισμό σημαντικών προϊόντων μετατροπής. Η ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής και, εφόσον είναι δυνατόν, ο ποσοτικός προσδιορισμός των συγκεντρώσεών τους έχουν ιδιαίτερη σημασία για τις ουσίες πολύ βραδείας ανοργανοποίησης (π.χ. με χρόνο υποδιπλασιασμού του ολικού υπολειμματικού ^{14}C μεγαλύτερο των 60 ημερών). Λόγω αναλυτικών περιορισμών, για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των σημαντικών προϊόντων μετατροπής απαιτούνται συνήθως υψηλότερες συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. > 100 μg/l).

Ως χαμηλή συγκέντρωση, στη συγκεκριμένη δοκιμή, νοείται μια συγκέντρωση αρκούντως χαμηλή (π.χ. μικρότερη από 1 μg/l έως 100 μg/l), ώστε να εξασφαλίζεται ότι η κινητική βιοαποικοδόμησης που θα προκύψει από τη δοκιμή θα αντικατοπτρίζει την κινητική που αναμένεται να παρατηρηθεί στο περιβάλλον. Σε σύγκριση με τη συνολική μάζα των βιοαποικοδομήσιμων ανθρακούχων υποστρωμάτων που υπάρχουν στο χρησιμοποιούμενο για τη δοκιμή φυσικό νερό, η ελεγχόμενη ουσία σε χαμηλή συγκέντρωση θα χρησιμεύσει ως δευτερεύον υπόστρωμα. Αυτό προϋποθέτει ότι η προβλεπόμενη κινητική βιοαποικοδόμησης είναι πρώτης τάξεως («μη αυξητική» κινητική) και ότι η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να αποικοδομηθεί με «συμμεταβολισμό». Η κινητική πρώτης τάξεως υποδηλώνει ότι η ταχύτητα αποικοδόμησης (mg/L/ημέρα) είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, η οποία ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου. Στις πραγματικές αντιδράσεις πρώτης τάξεως, η ειδική σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης, k, δεν εξαρτάται από τον χρόνο και τη συγκέντρωση. Η σταθερά k, δηλαδή, δεν παρουσιάζει σημαντική διακύμανση στη διάρκεια ενός πειράματος και δεν μεταβάλλεται με την αύξηση της συγκέντρωσης μεταξύ των πειραμάτων. Εξ ορισμού, η ειδική σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης ισούται προς τη σχετική μεταβολή της συγκέντρωσης ανά μονάδα χρόνου: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Αν και υπό τις οριζόμενες συνθήκες αναμένεται κανονικά κινητική πρώτης τάξεως, ενδέχεται να υπάρξουν περιστάσεις υπό τις οποίες είναι καταλληλότερη μια κινητική άλλης τάξεως. Παρεκκλίσεις από την κινητική πρώτης τάξεως μπορούν να παρατηρηθούν, επί παραδείγματι, σε περίπτωση που φαινόμενα μεταφοράς μάζας, όπως η ταχύτητα διάχυσης και όχι η ταχύτητα βιολογικής αντίδρασης, ελαττώνουν την ταχύτητα βιομετατροπής. Ωστόσο, σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, τα δεδομένα είναι δυνατόν να περιγραφούν με κινητική ψευδοπρώτης τάξεως με την παραδοχή σταθεράς ταχύτητας εξαρτώμενης από τη συγκέντρωση.

▼M1

Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, είναι σκόπιμο να διατίθενται πληροφορίες σχετικά με τη βιοαποικοδομησιμότητα της ελεγχόμενης ουσίας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (επί παραδείγματι, από συνήθεις δοκιμές διαλογής — screening tests), καθώς και στοιχεία για την αβιοτική αποικοδομησιμότητα, τα προϊόντα μετατροπής και τις σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τον προγραμματισμό του πειράματος και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η χρήση ελεγχόμενων ουσιών σημασμένων με ^{14}C και ο προσδιορισμός της κατανομής του ^{14}C μεταξύ των φάσεων στο τέλος της δοκιμής επιτρέπουν τον προσδιορισμό της τελικής βιοαποικοδόμησης. Σε περίπτωση χρησιμοποίησης μη σημασμένης ελεγχόμενης ουσίας, για να είναι δυνατή η εκτίμηση της τελικής βιοαποικοδόμησης πρέπει απαραιτήτως να διεξαχθεί η δοκιμή με υψηλότερη συγκέντρωση και να είναι γνωστά όλα τα σημαντικά προϊόντα μετατροπής.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Πρωταρχική βιοαποικοδόμηση: Η μεταβολή της δομής (μετατροπή) χημικής ουσίας που προκαλείται από μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την απώλεια της χημικής ταυτότητάς της.

Λειτουργική βιοαποικοδόμηση: Η μεταβολή της δομής (μετατροπή) χημικής ουσίας που προκαλείται από μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την απώλεια συγκεκριμένης ιδιότητας.

Τελική αερόβια βιοαποικοδόμηση: Η διάσπαση χημικής ουσίας από μικροοργανισμούς, παρουσία οξυγόνου, προς διοξείδιο του άνθρακα, νερό και ανόργανα άλατα άλλων τυχόν συνυπαρχόντων στοιχείων (ανοργανοποίηση) και η παραγωγή νέας βιομάζας και οργανικών προϊόντων μικροβιακής βιοσύνθεσης.

Ανοργανοποίηση: Η διάσπαση χημικής ουσίας ή οργανικής ύλης από μικροοργανισμούς, παρουσία οξυγόνου, προς διοξείδιο του άνθρακα, νερό και ανόργανα άλατα άλλων τυχόν συνυπαρχόντων στοιχείων.

Λανθάνουσα φάση: Ο χρόνος που μεσολαβεί από την έναρξη μιας δοκιμής έως ότου προσαρμοστεί ο διασπών μικροοργανισμός και αυξηθεί ο βαθμός βιοαποικοδόμησης χημικής ουσίας ή οργανικής ύλης σε ανιχνεύσιμο επίπεδο (π.χ. 10 % της μέγιστης θεωρητικής βιοαποικοδόμησης ή μικρότερο ποσοστό, ανάλογα με την ακρίβεια της μεθόδου μέτρησης).

Μέγιστο επίπεδο βιοαποικοδόμησης: Ο βαθμός βιοαποικοδόμησης χημικής ουσίας ή οργανικής ύλης σε μια δοκιμή, καταγραφόμενος σε ποσοστό επί τοις εκατό, άνω του οποίου δεν σημειώνεται περαιτέρω βιοαποικοδόμηση στη διάρκεια της δοκιμής.

Πρωταρχικό υπόστρωμα: Σύνολο φυσικών πηγών άνθρακα και ενέργειας που εξασφαλίζουν την ανάπτυξη και διατήρηση της μικροβιακής βιομάζας.

Δευτερεύον υπόστρωμα: Συστατικό υποστρώματος, του οποίου η συγκέντρωση είναι τόσο χαμηλή, ώστε η αποικοδόμησή του να εξασφαλίζει ασήμαντες ποσότητες άνθρακα και ενέργειας για τους σχετικούς μικροοργανισμούς, σε σύγκριση με τον άνθρακα και την ενέργεια που εξασφαλίζονται μέσω της αποικοδόμησης των βασικών συστατικών του υποστρώματος (πρωτεύοντα υποστρώματα).

Σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης: Σταθερά ταχύτητας κινητικής πρώτης τάξεως ή ψευδοπρώτης τάξεως, k (d^{-1}), η οποία δηλώνει την ταχύτητα των διεργασιών αποικοδόμησης. Σε μια δοκιμή διαλείποντος έργου, η σταθερά k υπολογίζεται από το πρώτο τμήμα της καμπύλης αποικοδόμησης μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης.

▼M1

Χρόνος υποδιπλασιασμού, $t_{1/2}$ (d): Όρος που χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της ταχύτητας μιας αντίδρασης πρώτης τάξεως. Είναι ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθεί η συγκέντρωση στο ήμισυ. Η σχέση του χρόνου υποδιπλασιασμού με τη σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης παρίσταται από την εξίσωση $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Ημιπερίοδος αποικοδόμησης, DT_{50} (d): Όρος που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος των δοκιμών βιοαποικοδόμησης. Είναι ο χρόνος, συμπεριλαμβανομένης της λανθάνουσας φάσης, που απαιτείται για να επιτευχθεί βιοαποικοδόμηση κατά 50 %.

Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ): Το όριο ανίχνευσης (LOD) είναι η συγκέντρωση μιας ουσίας κάτω από την οποία δεν είναι δυνατόν να γίνει διάκριση της ταυτότητας της ουσίας από τις αναλυτικές τεχνητές ενδείξεις. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) είναι η συγκέντρωση μιας ουσίας κάτω από την δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης με αποδεκτή ακρίβεια.

Διαλελυμένος οργανικός άνθρακας (DOC): Το μέρος του οργανικού άνθρακα σε ένα δείγμα νερού που δεν μπορεί να απομακρυνθεί με καθορισμένη τεχνική διαχωρισμού φάσεων, όπως επί παραδείγματι με φυγοκέντριση σε 40 000 ms^{-2} επί 15 min ή με διήθηση μέσω μεμβρανών με πόρους διαμέτρου 0,2 μm-0,45 μm.

Συνολική ραδιενέργεια οργανικού ^{14}C (TOA): Η συνολική ραδιενέργεια ^{14}C που συσχετίζεται με οργανικό άνθρακα.

Ραδιενέργεια διαλελυμένου οργανικού ^{14}C (DOA): Η συνολική ραδιενέργεια ^{14}C που συσχετίζεται με διαλελυμένο οργανικό άνθρακα.

Ραδιενέργεια σωματιδιακού οργανικού ^{14}C (POA): Η συνολική ραδιενέργεια ^{14}C που συσχετίζεται με οργανικό άνθρακα σε σωματίδια.

1.3. ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η παρούσα προσομοιωτική δοκιμή εφαρμόζεται σε μη πτητικές ή ελαφρώς πτητικές οργανικές ουσίες που ελέγχονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Εφόσον χρησιμοποιούνται φιάλες που επικοινωνούν με τον ατμοσφαιρικό αέρα (π.χ. πωματισμένες με βύσμα υαλοβάμβακα), ουσίες με σταθερά του νόμου του Henry μικρότερη από 1 $Pa \cdot m^3/mol$ περίπου (της τάξεως των 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) μπορούν να θεωρηθούν, στην πράξη, ως μη πτητικές. Χρησιμοποιώντας κλειστές φιάλες με διάκενο, είναι δυνατόν να ελεγχθούν ελαφρώς πτητικές ουσίες (με σταθερά του νόμου του Henry < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ ή < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$), χωρίς να υπάρξουν απώλειες από το σύστημα δοκιμής. Εάν δεν ληφθούν οι απαιτούμενες προφυλάξεις κατά την απομάκρυνση του CO_2 μπορεί να σημειωθεί απώλεια ουσιών σημασμένων με ^{14}C. Σε τέτοιου είδους καταστάσεις, ενδέχεται να χρειαστεί παγίδευση του CO_2 σε έναν εσωτερικό σύστημα απορρόφησης που περιέχει άλκαλι, ή χρησιμοποίηση εξωτερικού συστήματος απορρόφησης του CO_2 (άμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$, βλέπε παράρτημα 3). Για τον προσδιορισμό της κινητικής της βιοαποικοδόμησης, οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να είναι χαμηλότερες από τη διαλυτότητά της στο νερό. Αξίζει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι οι τιμές υδατοδιαλυτότητας που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ενδέχεται να είναι αρκετά υψηλότερες από τη διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας στο φυσικό νερό. Εναλλακτικά, η διαλυτότητα των ιδιαίτερα δυσδιάλυτων στο νερό ελεγχόμενων ουσιών μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας το φυσικό νερό της δοκιμής.

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προσομοίωση της βιοαποικοδόμησης σε επιφανειακά ύδατα απαλλαγμένα αδρομερών σωματιδίων («πελαγική δοκιμή») ή σε θολερά επιφανειακά ύδατα τα οποία ενδέχεται να απαντούν, επί παραδείγματι, κοντά σε διεπαφή νερού/ιζημάτων («δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος»).

▼M1

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η δοκιμή διεξάγεται με διαδικασία διαλείποντος έργου. Η ελεγχόμενη ουσία επωάζεται είτε μόνο σε επιφανειακά ύδατα («πελαγική δοκιμή») ή σε επιφανειακά ύδατα, στα οποία έχει προστεθεί εναιώρημα στερεών/ιζήματος σε συγκέντρωση από 0,01 έως 1 g/L ξηρού βάρους («δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος»), με σκοπό την προσομοίωση υδάτινου όγκου με αιωρούμενα στερεά ή ιζήματα σε επαναιώρηση. Η συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών/ιζημάτων στα περισσότερα επιφανειακά ύδατα αντιστοιχεί στο κατώτερο άκρο της ανωτέρω περιοχής τιμών. Οι δοκιμαστικές φιάλες επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό αερόβιες συνθήκες και ανακίνηση. Για τον προσδιορισμό της κινητικής της αποικοδόμησης πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο τουλάχιστον διαφορετικές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, η καθεμία από τις οποίες θα είναι πενταπλάσια έως δεκαπλάσια της προηγούμενης. Οι συγκεντρώσεις αυτές πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές του εύρους των αναμενόμενων συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας στο περιβάλλον. Η μέγιστη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 μg/L, προτιμώνται ωστόσο μέγιστες συγκεντρώσεις δοκιμής κάτω των 10 μg/L ή μικρότερες, ώστε να εξασφαλίζεται ότι η κινητική της βιοαποικοδόμησης είναι πρώτης τάξεως. Η χαμηλότερη συγκέντρωση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 μg/L, αλλά είναι προτιμότερο οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις να είναι της τάξεως των 1-2 μg/L ή μικρότερες από 1 μg/L. Κατά κανόνα, επαρκής ανάλυση τόσο χαμηλών συγκεντρώσεων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση διαθέσιμων στο εμπόριο ουσιών σημασμένων με ^{14}C. Λόγω αναλυτικών περιορισμών, είναι συχνά αδύνατο να μετρηθεί η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας με την απαιτούμενη ακρίβεια, όταν η ουσία αυτή χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση ≤ 100 μg/L (βλέπε παράγραφο 1.7.2 δεύτερο εδάφιο). Για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό σημαντικών προϊόντων μετατροπής ή σε περίπτωση που δεν διατίθεται ειδική αναλυτική μέθοδος με χαμηλό όριο ανίχνευσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας (> 100 μg/L και ορισμένες φορές > 1 mg/L). Όταν όμως η δοκιμή διεξάγεται με υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, τα αποτελέσματα ενδέχεται να μη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της σταθεράς αποικοδόμησης πρώτης τάξεως και του χρόνου υποδιπλασιασμού, δεδομένου ότι, πιθανότατα, η κινητική της αποικοδόμησης δεν θα είναι πρώτης τάξεως.

Η αποικοδόμηση παρακολουθείται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα με μέτρηση είτε του υπολειμματικού άνθρακα ^{14}C ή της υπολειμματικής συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας, όταν εφαρμόζεται ειδική μέθοδος χημικής ανάλυσης. Η σήμανση με ^{14}C του σταθερότερου τμήματος του μορίου επιτρέπει τον προσδιορισμό της συνολικής ανοργανοποίησης, ενώ η σήμανση με ^{14}C ενός λιγότερο σταθερού τμήματος του μορίου, καθώς και η εφαρμογή ειδικής αναλυτικής μεθόδου, επιτρέπουν την εκτίμηση μόνο της πρωταρχικής βιοαποικοδόμησης. Το σταθερότερο τμήμα του μορίου, ωστόσο, δεν περιλαμβάνει αναγκαστικά τη σημαντική λειτουργική ομάδα του (η οποία μπορεί να συνδέεται με μία ειδική ιδιότητα, όπως η τοξικότητα, η βιοσυσώρευση, κλπ.). Στην περίπτωση αυτή, είναι ενδεχομένως σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί ελεγχόμενη ουσία σημασμένη με ^{14}C στη λειτουργική ομάδα, ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση της εξάλειψης της συγκεκριμένης ιδιότητας.

1.5. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Στην παρούσα δοκιμή μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο ραδιοσημασμένες, όσο και μη σημασμένες ελεγχόμενες ουσίες. Συνιστάται η σήμανση με ^{14}C, κατά κανόνα του ή των σταθερότερων τμημάτων του μορίου (βλέπε επίσης παράγραφο 1.4). Για τις ουσίες που περιέχουν περισσότερους του ενός αρωματικούς δακτυλίους, είναι προτιμότερο να σημαίνονται με ^{14}C ένα ή περισσότερα άτομα άνθρακα σε κάθε δακτύλιο. Επιπλέον, πρέπει κατά προτίμηση να σημαίνονται με ^{14}C ένα ή περισσότερα άτομα άνθρακα και στις δύο πλευρές των ευκόλως αποικοδομήσιμων δεσμών. Η χημική ή/και ραδιοχημική καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας απαιτείται να είναι > 95 %. Για τις ραδιοσημασμένες ουσίες, προκειμένου να διευκολυνθεί η μέτρηση του ^{14}C σε δοκιμές που διεξάγονται με χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις, προτιμάται η ειδική ραδιενέργεια να είναι της τάξεως των 50 μCi/mg (1,85 MBq) ή μεγαλύτερη. Πρέπει να διατίθενται οι ακόλουθες πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία:

▼M1

— διαλυτότητα στο νερό [μέθοδος Α.6],

— διαλυτότητα σε οργανικό(ούς) διαλύτη(ες) (ουσίες χρησιμοποιούμενες με διαλύτη ή δυσδιάλυτες στο νερό),

— σταθερά διαστάσεως (pKa), εφόσον η ουσία ελευθερώνει ή προσλαμβάνει πρωτόνια [κατευθυντήρια γραμμή TG 112 του ΟΟΣΑ] (5),

— τάση ατμών [μέθοδος Α.4] και σταθερά του νόμου του Henry,

— χημική σταθερότητα στο νερό και στο σκοτάδι (υδρόλυση) [μέθοδος Γ.7].

Όταν διεξάγονται δοκιμές δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών σε θαλασσινό νερό, μπορεί να είναι χρήσιμο να είναι γνωστή η σταθερά εξαλάτωσης (ή «σταθερά Setschenow») K^s, η οποία ορίζεται ως εξής: $\log (S/S') = K^s C_m$, όπου S και S' είναι η διαλυτότητα της ουσίας σε γλυκό νερό και θαλασσινό νερό, αντιστοίχως, ενώ C_m είναι η μοριακή συγκέντρωση του άλατος.

Εάν διεξάγεται «δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος», θα πρέπει να διατίθενται επιπλέον οι ακόλουθες πληροφορίες:

— συντελεστής κατανομής σε μίγμα n-οκτανόλης/νερού [μέθοδος Α.8],

— συντελεστής προσρόφησης [μέθοδος Γ.18].

Άλλες χρήσιμες πληροφορίες είναι οι εξής:

— συγκέντρωση στο περιβάλλον, εφόσον είναι γνωστή ή έχει εκτιμηθεί,

— τοξικότητα της ελεγχόμενης ουσίας για τους μικροοργανισμούς [μέθοδος Γ.11],

— άμεση ή/και εγγενής βιοαποικοδομησιμότητα [μέθοδοι Γ.4 Α-ΣΤ, Γ.12, Γ.9, κατευθυντήρια γραμμή TG 302 του ΟΟΣΑ (5)],

— αερόβια ή αναερόβια βιοαποικοδομησιμότητα στο έδαφος και μελέτες μετατροπής στη διεπαφή ιζήματος/νερού [μέθοδοι Γ.23, Γ.24].

1.6. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως ουσία αναφοράς μία ουσία η οποία κατά κανόνα αποικοδομείται εύκολα υπό αερόβιες συνθήκες (π.χ. ανιλίνη ή βενζοϊκό νάτριο). Ο αναμενόμενος χρόνος αποικοδόμησης της ανιλίνης και του βενζοϊκού νατρίου είναι συνήθως μικρότερος από 2 εβδομάδες. Η ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται με σκοπό να εξασφαλιστεί ότι η μικροβιακή δραστικότητα του νερού δοκιμής περικλείεται εντός ορισμένων ορίων, δηλαδή ότι το νερό περιέχει ενεργή μικροβιακή χλωρίδα.

▼M1

1.7. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

1.7.1. **Ανάκτηση**

Αμέσως μετά την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας, κάθε αρχική συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να επαληθεύεται με μέτρηση της ραδιενέργειας του ^{14}C, η με χημική ανάλυση εφόσον πρόκειται για μη σημασμένη ουσία, τουλάχιστον σε διπλά δείγματα. Με τον τρόπο αυτό συγκεντρώνονται πληροφορίες για τη δυνατότητα εφαρμογής και την επαναληπτικότητα της αναλυτικής μεθόδου, καθώς και για την ομοιογενή κατανομή της ελεγχόμενης ουσίας. Κατά κανόνα, στη μετέπειτα ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιείται η μετρούμενη αρχική ραδιενέργεια του ^{14}C ή η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας και όχι η ονομαστική συγκέντρωση, καθώς με τον τρόπο αυτό αντισταθμίζονται οι απώλειες λόγω ρόφησης και τα σφάλματα δοσολογίας. Για τις σημασμένες με ^{14}C ελεγχόμενες ουσίες, ο βαθμός ανάκτησης στο τέλος του πειράματος προκύπτει από το ισοζύγιο μάζας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.4 τελευταίο εδάφιο). Στην ιδανική περίπτωση, το ισοζύγιο της ραδιοσημασμένης μάζας πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 90 % και 110 % ενώ, για τις μη σημασμένες ελεγχόμενες ουσίες, η αναλυτική ακρίβεια θα πρέπει να συνεπάγεται αρχική ανάκτηση μεταξύ 70 % και 110 %. Τα εν λόγω πεδία τιμών πρέπει να ερμηνεύονται ως στόχοι και να μην χρησιμοποιούνται ως κριτήρια αποδοχής της δοκιμής. Εναλλακτικά, μπορεί να προσδιορίζεται η αναλυτική ακρίβεια για την ελεγχόμενη ουσία σε συγκέντρωση μικρότερη από την αρχική, καθώς και για τα σημαντικά προϊόντα μετατροπής.

1.7.2. **Επαναληπτικότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου**

Η επαναληπτικότητα της αναλυτικής μεθόδου (συμπεριλαμβανομένης της αποδοτικότητας της αρχικής συλλογής), όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας, καθώς και των προϊόντων μετατροπής, κατά περίπτωση, θα πρέπει να ελέγχεται με πενταπλή ανάλυση των επιμέρους δειγμάτων των επιφανειακών υδάτων.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) της αναλυτικής μεθόδου για την ελεγχόμενη ουσία και για τα προϊόντα μετατροπής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 % της αρχικής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο σύστημα δοκιμής, εφόσον αυτό είναι δυνατόν. Το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) θα πρέπει να είναι ίσο ή μικρότερο από 10 % της χρησιμοποιηθείσας συγκέντρωσης. Οι χημικές αναλύσεις πολλών οργανικών ουσιών και των προϊόντων μετατροπής τους απαιτούν συχνά η ελεγχόμενη ουσία να χρησιμοποιείται σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση, δηλαδή > 100 μg/L.

1.8. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.8.1. **Εξοπλισμός**

Για την εκτέλεση της δοκιμής μπορούν να χρησιμοποιηθούν κωνικές ή κυλινδρικές φιάλες κατάλληλης χωρητικότητας (π.χ. 0,5 ή 1 λίτρου), πωματισμένες με πώματα από σιλικόνη ή καουτσούκ, ή φιάλες ορού με αδιαπέραστα από το CO_2 καλύμματα (π.χ. με διαφράγματα από βουτυλοκαουτσούκ). Μία άλλη δυνατότητα είναι να χρησιμοποιηθούν πολλές φιάλες και να λαμβάνεται ως δείγμα ολόκληρο το περιεχόμενο μιας φιάλης, τουλάχιστον εις διπλούν, σε κάθε χρονικό διάστημα δειγματοληψίας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 τελευταίο εδάφιο). Για μη πτητικές μη ραδιοσημασμένες ελεγχόμενες ουσίες, δεν απαιτούνται αεροστεγή πώματα ή καλύμματα· μπορούν να χρησιμοποιηθούν χαλαρά βύσματα βάμβακα που εμποδίζουν τη μόλυνση από τον αέρα (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 δεύτερο εδάφιο). Οι ελαφρά πτητικές ουσίες πρέπει να ελέγχονται σε σύστημα βιομετρικού τύπου με ήπια ανάδευση της επιφάνειας του νερού. Προκειμένου να αποκλειστεί κάθε ενδεχόμενο βακτηριακής μόλυνσης, τα δοχεία μπορούν να αποστειρωθούν με θέρμανση ή σε αυτόκλειστο πριν από τη χρήση τους. Χρησιμοποιείται επίσης ο ακόλουθος συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός:

— συσκευή ανατάραξης ή μαγνητικοί αναδευτήρες για συνεχή ανακίνηση των δοκιμαστικών φιαλών,

▼M1

— φυγόκεντρος,

— πεχάμετρο,

— θολοσίμετρο για νεφελομετρικές μετρήσεις της θολερότητας,

— πυριατήριο ή φούρνος μικροκυμάτων για προσδιορισμούς ξηρού βάρους,

— συσκευή διήθησης με μεμβράνη,

— αυτόκλειστο ή κλίβανος για την αποστείρωση των γυάλινων σκευών,

— εγκαταστάσεις για τον χειρισμό σημασμένων με ^{14}C ουσιών,

— εξοπλισμός για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ραδιενέργειας του ^{14}C σε δείγματα διαλυμάτων που παγιδεύουν το CO_2 και, εφόσον απαιτείται, σε δείγματα ιζημάτων,

— αναλυτικός εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας (και της ουσίας αναφοράς), σε περίπτωση ειδικής χημικής ανάλυσης (π.χ. αέριος χρωματογράφος, υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης).

1.8.2. **Μητρικά διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας**

Για την παρασκευή των μητρικών διαλυμάτων της ελεγχόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό (βλέπε παράγραφο 1.8.7 πρώτο εδάφιο). Το απιονισμένο νερό δεν πρέπει να περιέχει ουσίες ενδεχομένως τοξικές για τους μικροοργανισμούς, ενώ η περιεκτικότητά του σε διαλελυμένο οργανικό άνθρακα (DOC) δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 mg/L (6).

1.8.3. **Συλλογή και μεταφορά των επιφανειακών υδάτων**

Ο χώρος της δειγματοληψίας από τα επιφανειακά ύδατα πρέπει να επιλέγεται ανάλογα με το σκοπό της δοκιμής στην εκάστοτε περίπτωση. Κατά την επιλογή των χώρων δειγματοληψίας, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το πιθανό ιστορικό γεωργικών, βιομηχανικών ή αστικών εισροών. Υδάτινο περιβάλλον για το οποίο είναι γνωστό ότι έχει ρυπανθεί από την ελεγχόμενη ουσία ή από ουσίες ανάλογης δομής κατά την προηγούμενη τετραετία, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συλλογή νερού δοκιμής, εκτός εάν ρητός σκοπός του αναλυτή είναι να διερευνήσει την ταχύτητα αποικοδόμησης σε χώρους εκτεθέντες στο παρελθόν στην ελεγχόμενη ουσία. Θα πρέπει να μετράται το pH και η θερμοκρασία του νερού στον χώρο δειγματοληψίας. Επίσης, πρέπει να σημειώνεται το βάθος από το οποίο συλλέγεται το δείγμα, καθώς και η όψη του δείγματος του νερού (π.χ. χρώμα και θολερότητα) (βλέπε παράγραφο 3). Απαιτείται μέτρηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου ή/και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού στο νερό και στην επιφανειακή στιβάδα του ιζήματος, προκειμένου να αποδειχθεί ότι επικρατούν αερόβιες συνθήκες, εκτός εάν αυτό προκύπτει σαφώς από την εμφάνιση και το ιστορικό του χώρου δειγματοληψίας. Τα επιφανειακά ύδατα πρέπει να μεταφέρονται σε απόλυτα καθαρό δοχείο. Η θερμοκρασία του δείγματος κατά τη διάρκεια της μεταφοράς δεν πρέπει να υπερβαίνει σημαντικά τη θερμοκρασία στην οποία εκτελείται η δοκιμή. Εάν η μεταφορά διαρκεί περισσότερο από 2 έως 3 ώρες, συνιστάται ψύξη στους 4 °C. Το δείγμα νερού δεν πρέπει να καταψύχεται.

▼M1

1.8.4. **Αποθήκευση και προετοιμασία των επιφανειακών υδάτων**

Η δοκιμή θα πρέπει να αρχίζει κατά προτίμηση εντός εικοσιτετραώρου από τη δειγματοληψία. Ο χρόνος αποθήκευσης του νερού, εφόσον αυτή είναι αναγκαία, πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο και να μην υπερβαίνει σε καμία περίπτωση, τις 4 εβδομάδες. Το δείγμα του νερού πρέπει να φυλάσσεται στους 4 °C και να αερίζεται έως ότου χρησιμοποιηθεί. Πριν από τη χρήση του δείγματος, πρέπει να απομακρύνονται τα αδρομερή σωματίδια, επί παραδείγματι με διήθηση μέσω ηθμού νάιλον με βροχίδες διαμέτρου 100 μm περίπου ή μέσω αδρού χάρτινου ηθμού ή με καθίζηση.

1.8.5. **Παρασκευή του τροποποιημένου με ίζημα νερού (προαιρετικό)**

Για τη δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, προστίθεται επιφανειακό ίζημα στις φιάλες που περιέχουν φυσικό νερό (από το οποίο έχουν απομακρυνθεί με διήθηση τα αδρομερή σωματίδια, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.8.4), ώστε να σχηματιστεί εναιώρημα. Η συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,01 και 1 g/L. Το επιφανειακό ίζημα πρέπει να προέρχεται από το χώρο από τον οποίο ελήφθη το δείγμα νερού. Ανάλογα με το συγκεκριμένο υδάτινο περιβάλλον, το επιφανειακό ίζημα μπορεί να χαρακτηρίζεται είτε από υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (2,5-7,5 %) και λεπτή υφή είτε από χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (0,5-2,5 %) και αδρή υφή (3). Το επιφανειακό ίζημα παρασκευάζεται ως εξής: με τη βοήθεια διαφανούς πλαστικού σωλήνα εξάγονται πολλά καρότα από το ίζημα, αποκόβονται τα ανώτερα αερόβια στρώματα (από την επιφάνεια μέχρι βάθους 5 mm κατ' ανώτατο όριο) αμέσως μετά τη δειγματοληψία και συνενώνονται. Το προκύπτον δείγμα ιζήματος μεταφέρεται σε δοχείο με μεγάλο διάκενο, ώστε το ίζημα να διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες (εάν η μεταφορά διαρκεί περισσότερο από 2-3 ώρες, το δείγμα ψύχεται στους 4 °C). Παρασκευάζεται εναιώρημα του δείγματος ιζήματος στο νερό της δοκιμής σε αναλογία 1:10 και φυλάσσεται αεριζόμενο στους 4 °C μέχρι τη χρήση του. Ο χρόνος αποθήκευσης του ιζήματος, εφόσον αυτή είναι αναγκαία, πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο και να μην υπερβαίνει σε καμία περίπτωση, τις 4 εβδομάδες.

1.8.6. **Ημισυνεχής διαδικασία (προαιρετική)**

Σε περίπτωση που η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, έως ότου καταστεί δυνατή η μέτρηση σημαντικής αποικοδόμησης της ελεγχόμενης ουσίας, είναι μεγάλη, μπορεί να χρειαστεί παρατεταμένη επώαση (επί πολλούς μήνες). Εάν αυτό είναι γνωστό από προηγούμενες δοκιμές με την εν λόγω ουσία, η δοκιμή μπορεί να αρχίσει με μία ημισυνεχή διαδικασία, η οποία παρέχει τη δυνατότητα περιοδικής ανανέωσης μέρους του νερού ή του εναιωρήματος (βλέπε παράρτημα 2). Εναλλακτικά, η κανονική δοκιμή διαλείποντος έργου μπορεί να μετατραπεί σε ημισυνεχή δοκιμή, εφόσον δεν έχει παρατηρηθεί αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας μετά την πάροδο 60 περίπου ημερών από την έναρξη της διαδικασίας διαλείποντος έργου (βλέπε παράγραφο 1.8.8.3 δεύτερο εδάφιο).

1.8.7. **Προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας (ή της ουσίας αναφοράς)**

Για τις ευδιάλυτες στο νερό ουσίες (> 1 mg/L) χαμηλής πτητικότητας (σταθερά του νόμου του Henry < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ ή < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), μπορεί να παρασκευαστεί μητρικό διάλυμα σε απιονισμένο νερό (βλέπε παράγραφο 1.8.2). Προστίθεται ο κατάλληλος όγκος μητρικού διαλύματος στα δοκιμαστικά δοχεία, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση. Ο όγκος του τυχόν προστιθέμενου μητρικού διαλύματος πρέπει να περιορίζεται στον ελάχιστο πρακτικά εφικτό (< 10 % του όγκου του τελικού υγρού, εφόσον είναι δυνατόν). Μία άλλη διαδικασία συνίσταται στη διάλυση της ελεγχόμενης ουσίας σε μεγαλύτερο όγκο νερού δοκιμής, αντί της χρήσης οργανικών διαλυτών.

▼M1

Εφόσον δεν υπάρχει άλλη λύση, για την παρασκευή των μητρικών διαλυμάτων μη πτητικών δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών χρησιμοποιείται πτητικός οργανικός διαλύτης. Ωστόσο, η ποσότητα του προστιθέμενου στο σύστημα δοκιμής διαλύτη δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 % v/v ούτε να έχει δυσμενή επίδραση στη μικροβιακή δραστικότητα. Ο διαλύτης δεν πρέπει να επηρεάζει τη σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας στο νερό. Θα πρέπει να απομακρύνεται μέχρι να παραμείνει μία ελάχιστη ποσότητα, ώστε να μην αυξάνει σημαντικά τη συγκέντρωση DOC στο νερό ή στο εναιώρημα δοκιμής. Αυτό ελέγχεται με ειδική για τη συγκεκριμένη ουσία ανάλυση ή, εφόσον είναι δυνατόν, με ανάλυση του DOC (6). Λαμβάνεται μέριμνα ώστε η ποσότητα του μεταφερόμενου διαλύτη να περιορίζεται στην απολύτως αναγκαία και να εξασφαλίζεται ότι η ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας μπορεί να διαλυθεί στον τελικό όγκο του νερού της δοκιμής. Για την εισαγωγή της ελεγχόμενης ουσίας στα δοκιμαστικά δοχεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες τεχνικές, όπως περιγράφεται στην αναφερόμενη υπό (7) και (8) βιβλιογραφία. Όταν η ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιείται με φορέα οργανικό διαλύτη, οι μάρτυρες για το διαλύτη, που περιέχουν το νερό δοκιμής (χωρίς καμία προσθήκη) και το νερό της δοκιμής στο οποίο έχει προστεθεί ουσία αναφοράς, πρέπει να υποβάλλονται στην ίδια αγωγή όπως τα ενεργά δοκιμαστικά δοχεία που περιέχουν την ελεγχόμενη ουσία σε φορέα διαλύτη. Οι μάρτυρες για το διαλύτη χρησιμοποιούνται με σκοπό να εξεταστούν οι τυχόν δυσμενείς επιδράσεις του διαλύτη στη μικροβιακή χλωρίδα, όπως προκύπτουν από την αποικοδόμηση της ουσίας αναφοράς.

1.8.8. **Συνθήκες δοκιμής**

1.8.8.1. *Θερμοκρασία δοκιμής*

Η επώαση πρέπει να λαμβάνει χώρα στο σκοτάδι (κατά προτίμηση) ή σε διάχυτο φως σε ελεγχόμενη (± 2 °C) θερμοκρασία, η οποία μπορεί να είναι η επιτόπια θερμοκρασία ή μία πρότυπη θερμοκρασία 20-25 °C. Η επιτόπια θερμοκρασία αντιστοιχεί είτε στην πραγματική θερμοκρασία του δείγματος τη στιγμή της δειγματοληψίας ή στη μέση επιτόπια θερμοκρασία στο χώρο δειγματοληψίας.

1.8.8.2. *Ανακίνηση*

Απαιτείται συνεχής ανατάραξη ή ανάδευση, ώστε τα σωματίδια και οι μικροοργανισμοί να διατηρούνται σε εναιώρημα. Η ανακίνηση διευκολύνει επίσης τη μεταφορά οξυγόνου από το διάκενο στο υγρό, ούτως ώστε να επικρατούν συνεχώς αερόβιες συνθήκες. Οι φιάλες τοποθετούνται σε συσκευή ανατάραξης (περίπου στις 100 rpm) ή σε μαγνητικό ανάδευτήρα. Η ανακίνηση πρέπει να είναι συνεχής. Ωστόσο, η ανατάραξη ή η ανάδευση πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο ήπια, αλλά να διατηρεί συνεχώς την ομοιογένεια του εναιωρήματος.

1.8.8.3. *Διάρκεια της δοκιμής*

Κατά κανόνα, η διάρκεια της δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 60 ημέρες, εκτός εάν εφαρμόζεται η ημισυνεχής διαδικασία με περιοδική ανανέωση του εναιωρήματος (βλέπε παράγραφο 1.8.6 και παράρτημα 2). Στη διαδικασία διαλείποντος έργου, ωστόσο, ο χρόνος της δοκιμής μπορεί να παραταθεί σε 90 ημέρες κατ' ανώτατο όριο, εφόσον η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας έχει αρχίσει εντός των πρώτων 60 ημερών. Η αποικοδόμηση παρακολουθείται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα με προσδιορισμό της υπολειμματικής ραδιενέργειας του ^{14}C ή του εκλυόμενου $^{14}CO_2$ (βλέπε παράγραφο 1.8.9.4) ή/και με χημική ανάλυση (παράγραφος 1.8.9.5). Η διάρκεια της επώασης πρέπει να επαρκεί για την αξιολόγηση της διαδικασίας αποικοδόμησης. Κατά προτίμηση, ο βαθμός αποικοδόμησης πρέπει να υπερβαίνει το 50 %. Για τις βραδέως αποικοδομούμενες ουσίες, ο βαθμός αυτός πρέπει να είναι αρκούντως υψηλός (συνήθως μεγαλύτερος από 20 %), ώστε να μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης.

▼M1

Απαιτούνται περιοδικές μετρήσεις του pH και της συγκέντρωσης οξυγόνου στο σύστημα δοκιμής, εκτός εάν αυτές καθίστανται περιττές λόγω της κτηθείσας πείρας από ανάλογες δοκιμές με δείγματα νερού και ιζημάτων που συλλέχθηκαν στον ίδιο χώρο δειγματοληψίας. Υπό ορισμένες συνθήκες, ο μεταβολισμός πρωτευόντων υποστρωμάτων που απαντούν σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις στο νερό ή στο ίζημα ενδέχεται να προκαλέσει έκλυση CO_2 και μείωση του οξυγόνου σε βαθμό που να μεταβάλλονται σημαντικά οι πειραματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

1.8.9. **Διαδικασία**

1.8.9.1. *Προετοιμασία των φιαλών για την πελαγική δοκιμή*

Κατάλληλος όγκος νερού δοκιμής (όχι μικρότερος από 100 ml περίπου) μεταφέρεται στις δοκιμαστικές φιάλες ώστε αυτές να πληρούνται κατά το ένα τρίτο περίπου. Εάν χρησιμοποιούνται πολλαπλές φιάλες (ώστε να λαμβάνεται ως δείγμα ολόκληρο το περιεχόμενο μίας φιάλης σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας), ο κατάλληλος όγκος νερού δοκιμής είναι επίσης 100 ml περίπου, δεδομένου ότι μικροί όγκοι δειγμάτων ενδέχεται να επηρεάσουν τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης. Προστίθεται η ελεγχόμενη ουσία, η οποία λαμβάνεται από μητρικό διάλυμα, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 1.8.2 και 1.8.7. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, η μία πενταπλάσια έως δεκαπλάσια της άλλης, για τον προσδιορισμό της κινητικής της αποικοδόμησης και τον υπολογισμό της σταθεράς ταχύτητας αποικοδόμησης. Και οι δύο συγκεντρώσεις που επιλέγονται πρέπει να είναι χαμηλότερες των 100 μg/L και να κυμαίνονται, κατά προτίμηση, στην περιοχή < 1-10 μg/L.

Οι φιάλες πωματίζονται με πώματα ή καλύμματα αδιαπέραστα από τον ατμοσφαιρικό αέρα και το CO_2. Οι φιάλες που περιέχουν μη σημασμένες με ^{14}C μη πτητικές ελεγχόμενες ουσίες, μπορούν να πωματίζονται με χαλαρά βύσματα από υαλοβάμβακα που εμποδίζουν τη μόλυνση από τον ατμοσφαιρικό αέρα (βλέπε παράγραφο 1.8.1), υπό τον όρο ότι είναι γνωστή η μη πτητικότητα τυχόν σημαντικών προϊόντων αποικοδόμησης και ότι εκτελείται έμμεσος προσδιορισμός του CO_2 (βλέπε παράρτημα 3).

Οι φιάλες επωάζονται στη θερμοκρασία που έχει επιλεγεί (βλέπε παράγραφο 1.8.8.1). Λαμβάνονται δείγματα για χημική ανάλυση ή για μετρήσεις του ^{14}C κατά την έναρξη της δοκιμής (δηλαδή πριν αρχίσει η βιοαποικοδόμηση· βλέπε παράγραφο 1.7.1) και σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα κατά την πορεία της δοκιμής. Η δειγματοληψία μπορεί να συνίσταται στη λήψη επιμέρους δειγμάτων (π.χ. ποσοτήτων 5 ml) από καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες ή στη λήψη ολοκλήρου του περιεχομένου μιας φιάλης σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Η ανοργανοποίηση της ελεγχόμενης ουσίας προσδιορίζεται είτε έμμεσα είτε άμεσα (βλέπε παράρτημα 3). Για τον υπολογισμό αξιόπιστης σταθεράς ταχύτητας απαιτούνται συνήθως τουλάχιστον πέντε σημεία δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια της φάσης αποικοδόμησης (δηλαδή μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης), εκτός εάν είναι δυνατόν να τεκμηριωθεί ότι για τις ταχέως αποικοδομήσιμες ουσίες αρκούν τρία σημεία δειγματοληψίας. Για βραδέως αποικοδομούμενες ουσίες, μπορούν να διενεργηθούν άνετα περισσότερες μετρήσεις κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης και, στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται περισσότερα σημεία δεδομένων για τον υπολογισμό της σταθεράς k. Δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί πάγιο χρονοδιάγραμμα για τη δειγματοληψία, δεδομένου ότι η ταχύτητα βιοαποικοδόμησης ποικίλλει. Ωστόσο, σε περίπτωση βραδείας αποικοδόμησης, συνιστάται μία δειγματοληψία εβδομαδιαίως. Εάν η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας είναι ταχεία, θα πρέπει να διενεργείται μία δειγματοληψία ημερησίως κατά τις τρεις πρώτες ημέρες και, στη συνέχεια, μία ανά δύο ή τρεις ημέρες. Υπό ορισμένες περιστάσεις, όταν επί παραδείγματι η ουσία υδρολύεται ταχύτατα, ενδέχεται να χρειαστεί ωριαία δειγματοληψία. Συνιστάται η διεξαγωγή προκαταρκτικής μελέτης πριν από τη δοκιμή, προκειμένου να προσδιοριστούν τα ενδεδειγμένα διαστήματα δειγματοληψίας. Εάν πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα δείγματα για περαιτέρω ειδική ανάλυση, είναι σκόπιμο να λαμβάνονται περισσότερα δείγματα και, στη συνέχεια, να επιλέγονται εκείνα που θα αναλυθούν στο τέλος του πειράματος, ακολουθώντας μία στρατηγική της αντίστροφης σειράς, δηλαδή τα τελευταία δείγματα αναλύονται πρώτα (οδηγίες σχετικά με τη σταθερότητα των δειγμάτων κατά την αποθήκευση παρέχονται στην παράγραφο 1.8.9.5 δεύτερο εδάφιο).

▼M1

1.8.9.2. *Αριθμός φιαλών και δειγμάτων*

Ετοιμάζεται επαρκής αριθμός δοκιμαστικών φιαλών ως εξής:

— δοκιμαστικές φιάλες· διπλές τουλάχιστον φιάλες για κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας (κατά προτίμηση, τουλάχιστον 3) ή μία σειρά δοκιμαστικών φιαλών για κάθε συγκέντρωση, σε περίπτωση που συλλέγεται ολόκληρο το περιεχόμενο των φιαλών σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας (συμβολίζονται ως F_T),

— δοκιμαστικές φιάλες για τον υπολογισμό του ισοζυγίου της μάζας· διπλές τουλάχιστον φιάλες για κάθε ελεγχόμενη συγκέντρωση (συμβολίζονται ως F_M),

— τυφλός μάρτυρας, χωρίς ελεγχόμενη ουσία· τουλάχιστον μία φιάλη για την τυφλή δοκιμή, η οποία περιέχει μόνο το νερό δοκιμής (συμβολίζεται ως F_B),

— μάρτυρας αναφοράς· διπλές φιάλες που περιέχουν την ουσία αναφοράς (π.χ. ανιλίνη ή βενζοϊκό νάτριο, σε συγκέντρωση 10 μg/l) (συμβολίζονται ως F_C). Ο μάρτυρας αναφοράς χρησιμοποιείται για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ελάχιστης μικροβιακής δραστικότητας. Εφόσον εξυπηρετεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ραδιοσημασμένη ουσία αναφοράς. Αυτό ισχύει και στην περίπτωση που η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας παρακολουθείται με χημικές αναλύσεις,

— στείρος μάρτυρας· μία ή δύο φιάλες που περιέχουν αποστειρωμένο νερό δοκιμής για την εξέταση τυχόν αβιοτικής αποικοδόμησης ή άλλης μη βιολογικής εξάλειψης της ελεγχόμενης ουσίας (συμβολίζονται ως F_S). Η παύση της βιολογικής δραστηριότητας μπορεί να επιτευχθεί με τη θέρμανση του νερού δοκιμής σε αυτόκλειστο (121 °C, 20 λεπτά) ή με την προσθήκη τοξικού παράγοντα (π.χ. νατραζίδιο (NaN_3), 10-20 g/l, χλωριούχος υδράργυρος ($HgCl_2$), 100 mg/l, ή φορμαλδεΰδη, 100 mg/l) ή με ακτινοβόληση με ακτίνες γ. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται $HgCl_2$, μετά τη χρήση του θα πρέπει να αντιμετωπίζεται ως τοξικό απόβλητο. Η αποστείρωση νερού στο οποίο έχουν προστεθεί μεγάλες ποσότητες ιζήματος δεν είναι εύκολη και γι'αυτό συνιστάται επανειλημμένη θέρμανση σε αυτόκλειστο (π.χ. τρεις φορές). Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η αποστείρωση σε αυτόκλειστο μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση των σχετικών με τη ρόφηση χαρακτηριστικών του ιζήματος,

— μάρτυρες για το διαλύτη, που περιέχουν νερό δοκιμής και νερό δοκιμής στο οποίο έχει προστεθεί ουσία αναφοράς· διπλές φιάλες που περιέχουν την ίδια ποσότητα διαλύτη και υποβάλλονται στην ίδια διαδικασία με εκείνη που εφαρμόστηκε για την ελεγχόμενη ουσία. Σκοπός των μαρτύρων αυτών είναι να εξεταστούν οι τυχόν δυσμενείς επιδράσεις του διαλύτη με βάση την αποικοδόμηση της ουσίας αναφοράς.

Κατά το σχεδιασμό της δοκιμής, ο αναλυτής θα πρέπει να εξετάσει κατά πόσον είναι προτιμότερο να αυξηθεί το πλήθος των πειραμάτων ή η συχνότητα της δειγματοληψίας. Ο ακριβής αριθμός των απαιτούμενων φιαλών θα εξαρτηθεί από την εφαρμοζόμενη μέθοδο προσδιορισμού της αποικοδόμησης (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 τρίτο εδάφιο, παράγραφο 1.8.9.4 και παράρτημα 3).

▼M1

Από κάθε δοκιμαστική φιάλη πρέπει να λαμβάνονται δύο επιμέρους δείγματα (π.χ. ποσότητες 5 ml) σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Όταν χρησιμοποιούνται πολλαπλές φιάλες, ώστε να λαμβάνεται ως δείγμα ολόκληρο το περιεχόμενο της φιάλης, αυτές θα πρέπει να είναι τουλάχιστον δύο σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.1 πρώτο εδάφιο).

1.8.9.3. *Προετοιμασία των φιαλών για τη δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος [προαιρετική]*

Στα δοκιμαστικά δοχεία προστίθενται οι απαιτούμενοι όγκοι νερού δοκιμής και ιζήματος, εφόσον είναι αναγκαίο (βλέπε παράγραφο 1.8.5). Ο τρόπος προετοιμασίας των φιαλών για τη δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος είναι ο ίδιος με την πελαγική δοκιμή (βλέπε παραγράφους 1.8.9.1 και 1.8.9.2). Χρησιμοποιούνται κατά προτίμηση φιάλες ορού ή φιάλες αναλόγου σχήματος. Οι πωματισμένες φιάλες τοποθετούνται οριζόντια σε συσκευή ανατάραξης. Οι ανοικτές φιάλες που περιέχουν μη σημασμένες με ^{14}C μη πτητικές ουσίες τοποθετούνται προφανώς όρθιες — στην περίπτωση αυτή συνιστάται μαγνητική ανάδευση και χρήση μαγνητικών ράβδων επικαλυμμένων με γυαλί. Εφόσον είναι αναγκαίο, οι φιάλες αερίζονται, ώστε να εξασφαλίζονται κατάλληλες αερόβιες συνθήκες.

1.8.9.4. *Ραδιοχημικοί προσδιορισμοί*

Εκτελείται έμμεση και άμεση μέτρηση του εκλυόμενου $^{14}CO_2$ (βλέπε παράρτημα 3). Το $^{14}CO_2$ προσδιορίζεται έμμεσα από τη διαφορά μεταξύ της αρχικής ραδιενέργειας του ^{14}C στο νερό ή στο εναιώρημα δοκιμής και της συνολικής υπολειμματικής ραδιενέργειας κατά το χρόνο δειγματοληψίας, όπως μετράται μετά την οξίνιση του δείγματος μέχρι να επιτευχθεί pH 2-3 και την απομάκρυνση του CO_2. Δεδομένου ότι ο ανόργανος άνθρακας έχει απομακρυνθεί, η μετρούμενη υπολειμματική ραδιενέργεια οφείλεται στην οργανική ύλη. Ο έμμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$ δεν πρέπει να εκτελείται όταν μεταξύ των σημαντικών προϊόντων μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας περιλαμβάνονται πτητικές ενώσεις (βλέπε παράρτημα 3). Εφόσον είναι δυνατόν, το εκλυόμενο $^{14}CO_2$ θα πρέπει να μετράται άμεσα (βλέπε παράρτημα 3) σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας και σε μία τουλάχιστον δοκιμαστική φιάλη. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τον έλεγχο τόσο του ισοζυγίου μάζας όσο και της διαδικασίας βιοαποικοδόμησης, αλλά εφαρμόζεται μόνο στις δοκιμές που διεξάγονται με πωματισμένες φιάλες.

Σε περίπτωση άμεσης μέτρησης του εκλυόμενου $^{14}CO_2$ κατά τη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να προβλεφθούν περισσότερες φιάλες για το σκοπό αυτό κατά την έναρξη της δοκιμής. Ο άμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$ συνιστάται όταν μεταξύ των σημαντικών προϊόντων μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας περιλαμβάνονται πτητικές ενώσεις. Σε κάθε σημείο μέτρησης, οι επιπλέον δοκιμαστικές φιάλες οξινίζονται έως ότου επιτευχθεί pH 2-3 και το $^{14}CO_2$ συλλέγεται σε εσωτερικό ή εξωτερικό σύστημα απορρόφησης (βλέπε παράρτημα 3).

Εναλλακτικά, οι συγκεντρώσεις της σημασμένης με ^{14}C ελεγχόμενης ουσίας και των σημαντικότερων προϊόντων μετατροπής μπορούν να προσδιορισθούν με ραδιοχρωματογραφία (π.χ. χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, RAD–TLC) ή με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) με ραδιοχημική ανίχνευση.

Επίσης, μπορούν να προσδιοριστούν η κατανομή της υπολειμματικής ραδιενέργειας μεταξύ των φάσεων (βλέπε παράρτημα 1), καθώς και η υπολειμματική ελεγχόμενη ουσία και τα εναπομένοντα προϊόντα μετατροπής.

▼M1

Στο τέλος της δοκιμής θα πρέπει να προσδιορίζεται το ισοζύγιο μάζας με άμεση μέτρηση του $^{14}CO_2$, χρησιμοποιώντας χωριστές δοκιμαστικές φιάλες, από τις οποίες δεν λαμβάνεται κανένα δείγμα κατά την πορεία της δοκιμής (βλέπε παράρτημα 3).

1.8.9.5. *Ειδική χημική ανάλυση*

Σε περίπτωση που διατίθεται ευαίσθητη ειδική αναλυτική μέθοδος, η πρωταρχική βιοαποικοδόμηση μπορεί να εκτιμηθεί μετρώντας τη συνολική υπολειμματική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, αντί να χρησιμοποιηθούν τεχνικές ραδιοσήμανσης. Εφόσον χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη ουσία (για τη μέτρηση της συνολικής ανοργανοποίησης), είναι δυνατόν να διενεργηθούν παράλληλα ειδικές χημικές αναλύσεις, με σκοπό την άντληση χρήσιμων συμπληρωματικών πληροφοριών και τον έλεγχο της διαδικασίας. Ειδικές χημικές αναλύσεις μπορούν να εκτελούνται επίσης για τη μέτρηση των προϊόντων μετατροπής που σχηματίζονται κατά την αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας, συνιστώνται δε για ουσίες των οποίων η ημιπερίοδος ανοργανοποίησης υπερβαίνει τις 60 ημέρες. Θα πρέπει να μετράται και να αναφέρεται (ως συγκέντρωση και ως εκατοστιαία αναλογία της χρησιμοποιηθείσας ποσότητας) η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας και των προϊόντων μετατροπής σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Κατά κανόνα, τα προϊόντα μετατροπής που ανιχνεύονται σε ποσοστό ≥ 10 % της χρησιμοποιηθείσας συγκέντρωσης στον εκάστοτε χρόνο δειγματοληψίας πρέπει να ταυτοποιούνται, εκτός εάν αυτό είναι εύλογα περιττό. Θα πρέπει επίσης να εξετάζεται το ενδεχόμενο ταυτοποίησης προϊόντων μετατροπής των οποίων οι συγκεντρώσεις αυξάνονται συνεχώς κατά τη διάρκεια της μελέτης, έστω και αν οι συγκεντρώσεις τους δεν υπερβαίνουν το ανωτέρω όριο, δεδομένου ότι αυτό μπορεί να αποτελεί ένδειξη εμμονής. Σε περίπτωση που θεωρείται πιθανή η ταχεία αβιοτική μετατροπή της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. υδρόλυση), θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης των προϊόντων μετατροπής σε στείρους μάρτυρες. Η ανάγκη ποσοτικού προσδιορισμού και ταυτοποίησης των προϊόντων μετατροπής πρέπει να εξετάζεται κατά περίπτωση, η δε σχετική αιτιολόγηση να παρέχεται στην έκθεση της δοκιμής. Οι τεχνικές εκχύλισης με οργανικό διαλύτη πρέπει να εφαρμόζονται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στην αντίστοιχη μέθοδο ανάλυσης.

Όλα τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε αεροστεγή δοχεία και σε θερμοκρασία 2 έως 4 °C, εφόσον η ανάλυση εκτελείται εντός 24 ώρου (κατά προτίμηση). Όταν τα δείγματα αποθηκεύονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, θα πρέπει να καταψύχονται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από – 18 °C ή να διατηρούνται με χημικά συντηρητικά. Η μέθοδος της οξίνισης δεν συνιστάται για τη διατήρηση των δειγμάτων, διότι τα όξινα δείγματα ενδέχεται να είναι ασταθή. Σε περίπτωση που η ανάλυση δεν εκτελεστεί εντός 24 ώρου και απαιτηθεί μακρύτερος χρόνος αποθήκευσης, θα πρέπει να διεξαχθεί μελέτη σταθερότητας κατά την αποθήκευση, ώστε να αποδειχθεί η σταθερότητα των σημαντικών χημικών ουσιών υπό συνθήκες αποθήκευσης στους – 18 °C ή διατήρησης με συντηρητικά. Εάν η αναλυτική μέθοδος απαιτεί εκχύλιση με διαλύτη ή παραλαβή σε στερεά φάση, αυτή θα πρέπει να διενεργηθεί αμέσως μετά τη δειγματοληψία ή μετά την αποθήκευση του δείγματος υπό ψύξη επί 24 ώρες κατ' ανώτατο όριο.

Ανάλογα με την ευαισθησία της μεθόδου ανάλυσης, ενδέχεται να απαιτηθούν δείγματα μεγαλύτερου όγκου από εκείνους που αναφέρονται στην παράγραφο 1.8.1. Η δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί άνετα με όγκους ενός λίτρου σε φιάλες χωρητικότητας 2-3 λίτρων, όγκος που επιτρέπει τη συλλογή δειγμάτων των 100 ml περίπου.

▼M1

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

2.1.1. **Γραφική παράσταση των δεδομένων**

Οι χρόνοι δειγματοληψίας στρογγυλοποιούνται σε ακέραιο αριθμό ωρών (εκτός εάν η ουσία αποικοδομείται σε σημαντικό βαθμό εντός λεπτών ή ωρών), αλλά όχι σε ακέραιο αριθμό ημερών. Σχεδιάζεται γραμμικό και ημιλογαριθμικό διάγραμμα των τιμών της υπολειμματικής ραδιενέργειας της ελεγχόμενης ουσίας (για τις σημασμένες με ^{14}C ουσίες) ή της υπολειμματικής συγκέντρωσης (για τις μη σημασμένες ουσίες), ως προς το χρόνο, (βλέπε σχήματα 1α, 1β). Εφόσον υπήρξε αποικοδόμηση, συγκρίνονται τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις φιάλες F_T με εκείνα που λαμβάνονται από τις φιάλες F_S. Εάν η απόκλιση μεταξύ των μέσων όρων των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από τις φιάλες με ελεγχόμενη ουσία (F_T) και εκείνων που λαμβάνονται από τις στείρες φιάλες (F_S) είναι μικρότερη από 10 %, μπορεί να υποτεθεί ότι η παρατηρούμενη αποικοδόμηση είναι κατά κύριο λόγο αβιοτική. Σε περίπτωση που η αποικοδόμηση στις φιάλες F_S είναι μικρότερη, οι σχετικές τιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διόρθωση των τιμών που λαμβάνονται από τις φιάλες F_T (με αφαίρεση), προκειμένου να εκτιμηθεί ο βαθμός βιοαποικοδόμησης. Εφόσον διενεργούνται προαιρετικές αναλύσεις για τα σημαντικά προϊόντα μετατροπής, θα πρέπει να παρέχονται τα διαγράμματα του σχηματισμού και της ελάττωσης των προϊόντων αυτών επιπλέον του διαγράμματος της ελάττωσης της ελεγχόμενης ουσίας.

Υπολογίζεται η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης t_L με τη βοήθεια της καμπύλης αποικοδόμησης (ημιλογαριθμικό διάγραμμα) με παρεκβολή του ευθύγραμμου τμήματος σε μηδενική αποικοδόμηση ή, εναλλακτικά, με προσδιορισμό του χρόνου αποικοδόμησης κατά 10 % περίπου (βλέπε σχήματα 1α και 1β). Με τη βοήθεια του ημιλογαριθμικού διαγράμματος, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξεως, k, καθώς και το τυπικό σφάλμα της, με γραμμική παλινδρόμηση του ln (υπολειμματική ραδιενέργεια του ^{14}C ή συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας) προς το χρόνο. Όσον αφορά ειδικότερα τις μετρήσεις του ^{14}C, πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δεδομένα από το αρχικό ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης, επιλέγοντας κατά προτίμηση λίγα και αντιπροσωπευτικά δεδομένα και όχι περισσότερα αλλά αβέβαια. Η αβεβαιότητα, στην περίπτωση αυτή, περιλαμβάνει σφάλματα που είναι συνυφασμένα με τη συνιστώμενη άμεση χρήση των μετρούμενων τιμών υπολειμματικής ραδιενέργειας του ^{14}C (βλέπε κατωτέρω). Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν η αποικοδόμηση ακολουθεί διφασικό σχήμα, είναι δυνατόν να ενδείκνυται ο υπολογισμός δύο διαφορετικών σταθερών ταχύτητας. Για το σκοπό αυτό, οριοθετούνται δύο διαφορετικές φάσεις της καμπύλης αποικοδόμησης. Η σταθερά ταχύτητας k και ο χρόνος υποδιπλασιασμού $t_{½} = \ln 2/k$ πρέπει να υπολογίζονται για καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες, σε περίπτωση που λαμβάνονται επιμέρους δείγματα από την ίδια φιάλη, ή χρησιμοποιώντας μέσες τιμές, όταν συλλέγεται ολόκληρο το περιεχόμενο μίας φιάλης σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας (βλέπε παράγραφο 1.8.9.2 τελευταίο εδάφιο). Εφόσον εφαρμόζεται η πρώτη από τις προαναφερόμενες διαδικασίες, η σταθερά ταχύτητας και ο χρόνος υποδιπλασιασμού θα πρέπει να αναφέρονται για καθεμία από τις επιμέρους πολλαπλές φιάλες και ως μέση τιμή με τυπικό σφάλμα. Εάν έχουν χρησιμοποιηθεί υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, η καμπύλη αποικοδόμησης είναι δυνατόν να αποκλίνει σημαντικά από την ευθεία γραμμή (ημιλογαριθμικό διάγραμμα) και να μην ισχύει η κινητική πρώτης τάξεως. Στην περίπτωση αυτή, ο προσδιορισμός του χρόνου υποδιπλασιασμού είναι επομένως άσκοπος. Ωστόσο, για μια περιορισμένη περιοχή δεδομένων, είναι δυνατόν να εφαρμοστεί κινητική ψευδοπρώτης τάξεως και να υπολογιστεί η ημιπερίοδος αποικοδόμησης DT_{50} (χρόνος αποικοδόμησης κατά 50 %). Θα πρέπει να λαμβάνεται ωστόσο υπόψη ότι η χρονική πορεία της αποικοδόμησης πέρα από την επιλεγείσα περιοχή δεδομένων δεν μπορεί να προβλεφθεί βάσει της DT_{50}, η οποία περιγράφει μόνο ένα συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων. Υπάρχουν προσιτά αναλυτικά εργαλεία που διευκολύνουν τους στατιστικούς υπολογισμούς και την προσαρμογή των καμπυλών και συνιστάται η χρήση λογισμικού του είδους αυτού.

▼M1

Σε περίπτωση που εκτελούνται ειδικές χημικές αναλύσεις, οι σταθερές ταχύτητας και οι χρόνοι υποδιπλασιασμού για την πρωταρχικήαποικοδόμηση υπολογίζονται όπως περιγράφεται ανωτέρω για τη συνολική ανοργανοποίηση. Εάν η πρωταρχική αποικοδόμηση είναι το περιοριστικό στάδιο, μπορούν ορισμένες φορές να χρησιμοποιηθούν σημεία δεδομένων από ολόκληρη την πορεία της αποικοδόμησης, διότι πρόκειται για άμεσες μετρήσεις, σε αντίθεση με τις μετρήσεις της ραδιενέργειας του ^{14}C.

Όταν χρησιμοποιούνται ουσίες σημασμένες με ^{14}C, το ισοζύγιο μάζας θα πρέπει να εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό της χρησιμοποιηθείσας αρχικής συγκέντρωσης, τουλάχιστον στο τέλος της δοκιμής.

2.1.2. **Υπολειμματική ραδιενέργεια**

Κατά τη βιοαποικοδόμηση του σημασμένου με ^{14}C τμήματος μιας οργανικής ουσίας, το μεγαλύτερο μέρος του ^{14}C μετατρέπεται σε $^{14}CO_2$, ενώ ένα άλλο μέρος καταναλώνεται για την ανάπτυξη της βιομάζας ή/και τη σύνθεση εξωκυτταρικών μεταβολιτών. Επομένως, η πλήρης «τελική» βιοαποικοδόμηση μιας ουσίας δεν συνεπάγεται 100 % μετατροπή του άνθρακά της σε $^{14}CO_2$. Ο ^{14}C που είναι ενσωματωμένος στα σχηματιζόμενα με βιοσύνθεση προϊόντα αποδεσμεύεται στη συνέχεια βραδέως ως $^{14}CO_2$, ως αποτέλεσμα «δευτερογενούς ανοργανοποίησης». Για τους λόγους αυτούς, τα διαγράμματα της υπολειμματικής ραδιενέργειας του οργανικού ^{14}C (που μετράται μετά την απομάκρυνση του CO_2) ή του παραγόμενου $^{14}CO_2$ ως προς το χρόνο εμφανίζουν «ουρά» μετά την ολοκλήρωση της αποικοδόμησης. Αυτό δυσχεραίνει την κινητική ερμηνεία των δεδομένων και, ως εκ τούτου, για τον υπολογισμό της σταθεράς ταχύτητας αποικοδόμησης θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιείται μόνο το αρχικό τμήμα της καμπύλης (μετά το τέλος της λανθάνουσας φάσης και πριν επιτευχθεί αποικοδόμηση κατά 50 % περίπου). Όταν η ελεγχόμενη ουσία αποικοδομείται, η συνολική υπολειμματική ραδιενέργεια του οργανικού ^{14}C είναι πάντα υψηλότερη από τη ραδιενέργεια του ^{14}C που σχετίζεται με την εναπομένουσα ανέπαφη ελεγχόμενη ουσία. Εάν η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας αποτελεί αντίδραση πρώτης τάξεως και ένα σταθερό κλάσμα α ανοργανοποιείται σε CO_2, η αρχική κλίση της καμπύλης εξαφάνισης του ^{14}C (ολικός οργανικός άνθρακας ^{14}C ως προς το χρόνο) θα είναι απλάσια της κλίσης της αντίστοιχης καμπύλης για τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας (ή, ακριβέστερα, του τμήματος της ελεγχόμενης ουσίας που είναι σημασμένο με ^{14}C). Η χρησιμοποίηση των μετρήσεων της συνολικής ραδιενέργειας του οργανικού ^{14}C, χωρίς διόρθωση, συνεπάγεται ότι η υπολογιζόμενη σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης θα είναι χαμηλότερη. Στην βιβλιογραφία υπό (2)(9)-(10)(11) περιγράφονται διαδικασίες για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας από τις μετρηθείσες ραδιοχημικές δραστικότητες με βάση διάφορες απλουστευτικές υποθέσεις. Οι διαδικασίες αυτές εφαρμόζονται με ιδιαίτερη ευκολία στην περίπτωση των ταχέως αποικοδομήσιμων ουσιών.

2.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Εφόσον προκύψει ότι η σταθερά k δεν εξαρτάται από την προστιθέμενη συγκέντρωση (δηλαδή όταν η υπολογισθείσα σταθερά k είναι περίπου η ίδια για τις διάφορες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας), μπορεί να υποτεθεί ότι η σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξεως είναι αντιπροσωπευτική των συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δοκιμή δηλαδή της ελεγχόμενης ουσίας, του δείγματος νερού και της θερμοκρασίας της δοκιμής. Ένας εμπειρογνώμονας θα πρέπει να κρίνει κατά πόσον είναι δυνατή η γενίκευση ή παρεκβολή των αποτελεσμάτων της δοκιμής σε άλλα συστήματα. Σε περίπτωση που η ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις και για τον λόγο αυτό η αποικοδόμηση δεν ακολουθεί κινητική πρώτης τάξεως, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για τον απευθείας υπολογισμό της σταθεράς ταχύτητας πρώτης τάξεως ή του αντίστοιχου χρόνου υποδιπλασιασμού. Ωστόσο, τα δεδομένα που προκύπτουν από δοκιμή στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας, μπορούν να χρησιμεύσουν για την εκτίμηση του βαθμού της συνολικής ανοργανοποίησης ή/και για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων μετατροπής.

▼M1

Οι ταχύτητες άλλων διεργασιών απώλειας της ουσίας πέραν της βιοαποικοδόμησης (π.χ. υδρόλυση ή εξάτμιση), εφόσον είναι γνωστές, μπορούν να αφαιρεθούν από την ταχύτητα καθαρής απώλειας που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια της δοκιμής, ώστε να ληφθεί μία κατά προσέγγιση εκτίμηση της ταχύτητας βιοαποικοδόμησης. Τα σχετικά με την υδρόλυση δεδομένα, επί παραδείγματι, μπορούν να προκύψουν από τον στείρο μάρτυρα ή από παράλληλη δοκιμή, στην οποία χρησιμοποιούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας.

Ο έμμεσος και άμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$ (παράγραφος 1.8.9.4 και παράρτημα 3) μπορούν να χρησιμεύσουν μόνο για τον υπολογισμό του βαθμού ανοργανοποίησης της ελεγχόμενης ουσίας σε CO_2. Η ραδιοχρωματογραφία (RAD-TLC) ή η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτική ανάλυση της σημασμένης με ^{14}C ελεγχόμενης ουσίας και του σχηματισμού σημαντικών προϊόντων μετατροπής (παράγραφος 1.8.9.4 τρίτο εδάφιο). Για τον άμεσο υπολογισμό του χρόνου υποδιπλασιασμού είναι απαραίτητο να μην συνυπάρχουν σημαντικά προϊόντα μετατροπής (οριζόμενα με βάση τη συγκέντρωσή τους, η οποία είναι ≥ 10 % της χρησιμοποιηθείσας ποσότητας ελεγχόμενης ουσίας). Σε περίπτωση παρουσίας σημαντικών προϊόντων μετατροπής, όπως ορίζονται ανωτέρω, απαιτείται λεπτομερής αξιολόγηση των δεδομένων. Αυτή μπορεί να περιλαμβάνει επανάληψη της δοκιμής ή/και ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής (βλέπε παράγραφο 1.8.9.5 πρώτο εδάφιο), εκτός εάν η πορεία των προϊόντων μετατροπής μπορεί να εκτιμηθεί ευλόγως βάσει προηγούμενης εμπειρίας (π.χ. πληροφοριών για την οδό της αποικοδόμησης). Δεδομένου ότι η αναλογία του άνθρακα της ελεγχόμενης ουσίας που μετατρέπεται σε CO_2 ποικίλλει (εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας και από τα άλλα διαθέσιμα υποστρώματα, τις συνθήκες της δοκιμής και τη μικροβιακή χλωρίδα), η παρούσα δοκιμή δεν επιτρέπει την απευθείας εκτίμηση της τελικής βιοαποικοδόμησης, όπως στην περίπτωση της δοκιμής ελάττωσης του DOC. Το αποτέλεσμα όμως είναι ανάλογο εκείνου που λαμβάνεται με τη δοκιμή αναπνευσιομετρίας. Ο βαθμός ανοργανοποίησης θα είναι επομένως μικρότερος ή ίσος με τον ελάχιστο βαθμό τελικής βιοαποικοδόμησης. Για να ληφθεί πληρέστερη εικόνα της τελικής βιοαποικοδόμησης (ανοργανοποίηση και ενσωμάτωση στη βιομάζα), θα πρέπει να αναλυθεί η κατανομή του ^{14}C μεταξύ των φάσεων στο τέλος της δοκιμής (βλέπε παράρτημα 1). Ο ^{14}C στο σωματιδιακό υλικό θα συνίσταται στον ^{14}C που είναι ενσωματωμένος στη βακτηριακή βιομάζα και στον ^{14}C που έχουν ροφήσει τα οργανικά σωματίδια.

2.3. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εάν η ουσία αναφοράς δεν αποικοδομείται εντός του αναμενόμενου χρονικού διαστήματος (το οποίο για την ανιλίνη και το βενζοϊκό νάτριο είναι συνήθως μικρότερο από δύο εβδομάδες), η εγκυρότητα της δοκιμής είναι αμφισβητήσιμη και πρέπει να ελεγχθεί περαιτέρω, ή, εναλλακτικά, θα πρέπει να επαναληφθεί η δοκιμή με νέο δείγμα νερού. Σε μία κυκλική δοκιμή (ring-test) ISO της μεθόδου, στην οποία συμμετείχαν επτά ευρωπαϊκά εργαστήρια, οι προσαρμοσμένες σταθερές ταχύτητας της αποικοδόμησης της ανιλίνης κυμάνθηκαν από 0,3 έως 1,7 ημέρες^{-1} με μέσο όρο 0,8 ημέρες^{-1} στους 20 °C και τυπικό σφάλμα ± 0,4 ημέρες^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 ημέρες). Η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης ήταν συνήθως 1 έως 7 ημέρες. Τα ύδατα που εξετάστηκαν είχε αναφερθεί ότι περιείχαν βακτηριακή βιομάζα η οποία αντιστοιχούσε σε 10^3 — 10^4 μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU) ανά ml. Οι ταχύτητες αποικοδόμησης στα πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία ύδατα της κεντρικής Ευρώπης ήταν μεγαλύτερες εκείνων που παρατηρήθηκαν στα ολιγοτροφικά ύδατα της βόρειας Ευρώπης. Το γεγονός αυτό είναι δυνατόν να οφείλεται στη διαφορετική τροφική κατάσταση των εν λόγω υδάτων ή σε προηγούμενη έκθεση σε χημικές ουσίες.

Η συνολική ανάκτηση (ισοζύγιο μάζας) στο τέλος του πειράματος θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 90 % και 110 % για τις ραδιοσημασμένες ουσίες, ενώ, για τις μη σημασμένες ουσίες, η αρχική ανάκτηση κατά την έναρξη του πειράματος θα πρέπει να είναι 70 % έως 110 %. Ωστόσο, οι αναφερόμενες περιοχές τιμών είναι ενδεικτικές και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως κριτήρια για την αποδοχή της δοκιμής.

▼M1

3. **ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ**

Στην έκθεση της δοκιμής πρέπει να αναφέρεται σαφώς ο τύπος της μελέτης — πελαγική δοκιμή ή δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος — και να περιλαμβάνονται τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία και ουσία(ες) αναφοράς:

— κοινές ονομασίες, χημικές ονομασίες (κατά IUPAC ή/και ονομασίες CAS), αριθμοί CAS, συντακτικοί τύποι (με ένδειξη της θέσης του ^{14}C σε περίπτωση που χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ουσία) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας και της ουσίας αναφοράς (βλέπε παραγράφους 1.5 και 1.6),

— χημικές ονομασίες, αριθμοί CAS, συντακτικοί τύποι (με ένδειξη της θέσης του ^{14}C σε περίπτωση που χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ουσία) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων μετατροπής,

— καθαρότητα (προσμείξεις) της ελεγχόμενης ουσίας και της ή των ουσιών αναφοράς,

— ραδιοχημική καθαρότητα της σημασμένης χημικής ουσίας και ειδική ραδιενέργεια (κατά περίπτωση).

Επιφανειακά ύδατα:

Πρέπει να παρέχονται τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία σχετικά με το ληφθέν δείγμα νερού:

— θέση και περιγραφή του χώρου δειγματοληψίας συμπεριλαμβανομένου, εφόσον είναι δυνατόν, του ιστορικού της μόλυνσης,

— ημερομηνία και χρόνος δειγματοληψίας,

— θρεπτικά στοιχεία (ολικό N, αμμώνιο, νιτρώδη, νιτρικά, ολικός P, διαλελυμένα ορθοφωσφορικά),

— βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το δείγμα,

— εμφάνιση του δείγματος (π.χ. χρώμα και θολερότητα),

— διαλελυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) και ολικός οργανικός άνθρακας (TOC),

— βιολογικώς απαιτούμενο οξυγόνο (BOD),

— θερμοκρασία και pH στον τόπο και χρόνο δειγματοληψίας,

— οξυγόνο ή οξειδοαναγωγικό δυναμικό (υποχρεωτικό μόνο εφόσον οι αερόβιες συνθήκες δεν είναι προφανείς),

— αλατότητα ή αγωγιμότητα (για τα θαλάσσια και τα υφάλμυρα ύδατα),

— αιωρούμενα στερεά (σε περίπτωση θολερού δείγματος),

— ενδεχομένως, άλλες σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον τόπο της δειγματοληψίας κατά το χρόνο διενέργειάς της (π.χ. τρέχοντα ή ιστορικά δεδομένα για την ταχύτητα ροής ποταμών ή θαλάσσιων ρευμάτων, για σημαντικές απορρίψεις στην περιοχή και τα είδη των απορρίψεων αυτών, τις καιρικές συνθήκες πριν από το χρόνο δειγματοληψίας),

και προαιρετικά:

— μικροβιακή βιομάζα (π.χ. άμεση καταμέτρηση με πορτοκαλί της ακριδίνης ή μονάδες σχηματισμού αποικιών),

▼M1

— ανόργανος άνθρακας,

— συγκέντρωση χλωροφύλλης-α ως ειδικό μέτρο της βιομάζας φυκών.

Εάν διενεργείται δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, θα πρέπει να παρέχονται επιπλέον τα ακόλουθα στοιχεία:

— βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το ίζημα,

— εμφάνιση του ιζήματος (π.χ. χρωματισμένο, λασπώδες, αργιλώδες ή αμμώδες),

— υφή (π.χ. ποσοστό επί τοις εκατό αδρομερούς άμμου, λεπτής άμμου, ιλύος και αργίλου),

— ξηρό βάρος, σε g/l, των αιωρούμενων στερεών, συγκέντρωση ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) ή απώλεια βάρους κατά την ανάφλεξη, ως μέτρο της περιεχόμενης οργανικής ύλης,

— pH,

— οξυγόνο ή οξειδοαναγωγικό δυναμικό (υποχρεωτικό μόνον εφόσον οι αερόβιες συνθήκες δεν είναι προφανείς),

Συνθήκες δοκιμής:

— χρόνος που μεσολάβησε από τη δειγματοληψία μέχρι τη χρήση του δείγματος στην εργαστηριακή δοκιμή, αποθήκευση και προκατεργασία του δείγματος, ημερομηνίες διεξαγωγής των μελετών,

— ποσότητα χρησιμοποιηθείσας ελεγχόμενης ουσίας, συγκέντρωση δοκιμής και ουσία αναφοράς,

— τεχνική εισαγωγής της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της τυχόν χρήσης διαλυτών,

— όγκος των χρησιμοποιηθέντων επιφανειακών υδάτων και του ιζήματος (εφόσον χρησιμοποιήθηκε) και όγκος του δείγματος που ελήφθη για ανάλυση σε κάθε διάστημα,

— περιγραφή του χρησιμοποιηθέντος συστήματος δοκιμής,

εφόσον δεν επιβάλλεται να διατηρούνται συνθήκες σκότους, πληροφορίες για το «διάχυτο φως»,

— πληροφορίες σχετικά με την ή τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των στείρων μαρτύρων (π.χ. θερμοκρασία, χρόνος και αριθμός κατεργασιών σε αυτόκλειστο),

— θερμοκρασία επώασης,

— πληροφορίες σχετικά με τις τεχνικές ανάλυσης και την ή τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τις ραδιοχημικές μετρήσεις, καθώς και για τον έλεγχο του ισοζυγίου μάζας και τον προσδιορισμό της κατανομής μεταξύ των φάσεων (εφόσον διενεργήθηκε),

— πλήθος προσδιορισμών (replicates).

Αποτελέσματα:

— ποσοστά ανάκτησης (βλέπε παράγραφο 1.7.1),

— επαναληπτικότητα και ευαισθησία των μεθόδων ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων του ορίου ανίχνευσης (LOD) και του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) (βλέπε παράγραφο 1.7.2),

▼M1

— όλα τα μετρηθέντα δεδομένα (συμπεριλαμβανομένων των χρονικών σημείων δειγματοληψίας) και οι υπολογισθείσες τιμές, υπό μορφή πίνακα, καθώς και οι καμπύλες αποικοδόμησης· αναφέρεται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και για καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης της κλίσης του λογαριθμικού διαγράμματος, η εκτιμηθείσα λανθάνουσα φάση και μία σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξεως ή ψευδο-πρώτης τάξεως (εφόσον είναι δυνατόν), καθώς και η αντίστοιχη ημιπερίοδος αποικοδόμησης (ή ο χρόνος υποδιπλασιασμού, t_{50}),

— οι σημαντικές τιμές ως μέσοι όροι των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για καθεμία από τις πολλαπλές φιάλες, π.χ. διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης και ημιπερίοδος αποικοδόμησης (ή t_{50}),

— χαρακτηρισμός του συστήματος ως κατάλληλου ή μη, με κριτήρια την όψη της καμπύλης αποικοδόμησης και την ενδεχόμενη επίδραση της συγκέντρωσης δοκιμής,

— τα αποτελέσματα του τελικού ελέγχου του ισοζυγίου μάζας και τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της κατανομής μεταξύ των φάσεων (εφόσον διατίθενται),

— το κλάσμα του ανοργανοποιημένου ^{14}C και, εφόσον εκτελούνται ειδικές αναλύσεις, ο τελικός βαθμός πρωταρχικής αποικοδόμησης,

— ταυτοποίηση, μοριακή συγκέντρωση και ποσοστό επί τοις εκατό των προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν και των σημαντικών προϊόντων μετατροπής (βλέπε παράγραφο 1.8.9.5 πρώτο εδάφιο), κατά περίπτωση,

— προτεινόμενη πορεία μετατροπής, κατά περίπτωση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Μέθοδος δοκιμής Γ.23. Αερόβια και αναερόβια μετατροπή στο έδαφος.

4. Μέθοδος δοκιμής Γ.24. Αερόβια και αναερόβια μετατροπή σε υδατικά ιζηματικά συστήματα.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Ποιότητα νερού — Κατευθυντήριες οδηγίες για την παρασκευή και την επεξεργασία των ελάχιστα υδατοδιαλυτών οργανικών ενώσεων με προοπτική την αξιολόγηση της βιοδιασπασιμότητά τους σε υδατικό περιβάλλον.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Προσάρτημα 1

Κατανομή του ^{14}C μεταξύ των φάσεων

Προκειμένου να ελεγχθεί η εφαρμοσθείσα διαδικασία, οι συνήθεις μετρήσεις της υπολειμματικής συνολικής ραδιενέργειας του οργανικού ^{14}C (TOA) θα πρέπει να συμπληρωθούν με μετρήσεις του ισοζυγίου μάζας, όπου συμπεριλαμβάνεται ο άμεσος προσδιορισμός του εκλυόμενου $^{14}CO_2$ μετά την παγίδευσή του σε σύστημα απορρόφησης (βλέπε παράρτημα 3). Ο σχηματισμός $^{14}CO_2$ συνιστά, καθευατόν, άμεση απόδειξη βιοαποικοδόμησης, σε αντιδιαστολή με την αβιοτική αποικοδόμηση ή με άλλους μηχανισμούς απώλειας, όπως η εξάτμιση και η ρόφηση. Πρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες, χαρακτηριστικές της βιοαποικοδομησιμότητας, μπορούν να ληφθούν από τον προσδιορισμό της κατανομής της TOA μεταξύ της διαλελυμένης φάσης (ραδιενέργεια διαλελυμένου οργανικού ^{14}C, DOA) και της σωματιδιακής φάσης (ραδιενέργεια σωματιδιακού οργανικού ^{14}C, POA), μετά τον διαχωρισμό των σωματιδίων με διήθηση μέσω μεμβράνης ή φυγοκέντρηση. Η POA περιλαμβάνει την ελεγχόμενη ουσία που έχει ροφηθεί στη μικροβιακή βιομάζα ή σε άλλα σωματίδια, καθώς και τον άνθρακα της ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού και, επομένως, ενσωματώθηκε στο σωματιδιακό κλάσμα της βιομάζας. Ο σχηματιζόμενος διαλελυμένος οργανικός ^{14}C μπορεί να υπολογισθεί με βάση τη DOA στο τέλος της βιοαποικοδόμησης (οριζόντιο τμήμα της καμπύλης της αποικοδόμησης ως προς το χρόνο).

Για την εκτίμηση της κατανομής του υπολειμματικού ^{14}C μεταξύ των φάσεων σε επιλεγμένα δείγματα, τα δείγματα διηθούνται μέσω μεμβράνης από υλικό που δεν προσροφά σημαντικές ποσότητες ελεγχόμενης ουσίας (οι πολυανθρακικοί ηθμοί θεωρούνται κατάλληλοι), με πόρους διαμέτρου 0,22 μm ή 0,45 μm. Εάν η ρόφηση της ελεγχόμενης ουσίας στον ηθμό είναι τόσο σημαντική ώστε να μην μπορεί να αγνοηθεί (πρέπει να ελέγχεται πριν από την έναρξη της δοκιμής), η διήθηση μπορεί να αντικατασταθεί από φυγοκέντρηση σε υψηλή ταχύτητα (2 000 g x 10 min).

Το διήθημα ή το υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρησης υποβάλλεται στη διαδικασία που περιγράφεται στο παράρτημα 3 για τα μη διηθημένα δείγματα. Οι διηθητικές μεμβράνες διαλύονται σε κατάλληλο υγρό σπινθηρισμού και ακολουθεί καταμέτρηση, ως συνήθως, χρησιμοποιώντας, κατά κανόνα, μόνο τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου για να διορθωθεί η αναχαίτιση (quenching) ή μέσο οξείδωσης του δείγματος. Εάν διενεργήθηκε φυγοκέντρηση, παρασκευάζεται εναιώρημα του σβωλοποιημένου σωματιδιακού κλάσματος σε 1-2 ml απεσταγμένου νερού, το οποίο μεταφέρεται στη συνέχεια σε φιαλίδιο σπινθηρισμού. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με 1 ml απεσταγμένου νερού και τα εκπλύματα μεταφέρονται στο φιαλίδιο. Εφόσον χρειάζεται, το εναιώρημα μπορεί να ενσωματωθεί σε πηκτή για καταμέτρηση με υγρό σπινθηρισμό.

▼M1

Προσάρτημα 2

Ημισυνεχής διαδικασία

Για την επαρκή αποικοδόμηση των έμμονων ουσιών ενδέχεται να χρειαστεί παρατεταμένη επώαση επί πολλούς μήνες. Κανονικά, η διάρκεια της δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 60 ημέρες, εκτός εάν τα χαρακτηριστικά του αρχικού δείγματος νερού διατηρούνται με ανανέωση του εναιωρήματος της δοκιμής. Ωστόσο, μπορεί να παραταθεί έως 90 ημέρες, κατ' ανώτατο όριο, χωρίς ανανέωση του εναιωρήματος δοκιμής, εάν η αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας έχει αρχίσει εντός των πρώτων 60 ημερών.

Στη μακράς διαρκείας επώαση, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μείωση της ποικιλίας της μικροβιακής χλωρίδας, εξαιτίας διαφόρων μηχανισμών απώλειας και της ενδεχόμενης εξάντλησης των βασικών θρεπτικών στοιχείων και των πρωτευόντων ανθρακούχων υποστρωμάτων από το δείγμα νερού. Για τον ορθό προσδιορισμό της ταχύτητας αποικοδόμησης των βραδέως αποικοδομούμενων ουσιών συνιστάται, επομένως, η διεξαγωγή ημισυνεχούς δοκιμής. Η δοκιμή θα πρέπει να αρχίζει με ημισυνεχή διαδικασία εφόσον, βάσει προηγούμενης εμπειρίας, αναμένεται ότι θα απαιτηθεί τρίμηνη επώαση για την αποικοδόμηση της ουσίας κατά 20 %. Εναλλακτικά, η κανονική δοκιμή διαλείποντος έργου μπορεί να μετατραπεί σε ημισυνεχή δοκιμή εάν δεν παρατηρηθεί αποικοδόμηση της ελεγχόμενης ουσίας εντός 60 περίπου ημερών δοκιμής με τη διαδικασία διαλείποντος έργου. Η ημισυνεχής διαδικασία μπορεί να διακοπεί και η δοκιμή να συνεχιστεί με τη διαδικασία διαλείποντος έργου, εφόσον καταγραφεί σημαντική αποικοδόμηση (π.χ. > 20 %).

Στην ημισυνεχή δοκιμή, περίπου το ένα τρίτο του όγκου του εναιωρήματος δοκιμής αντικαθίσταται ανά δύο εβδομάδες από νερό που έχει συλλεγεί πρόσφατα, στο οποίο προστίθεται η ελεγχόμενη ουσία στην αρχική της συγκέντρωση. Ομοίως, εφόσον διεξάγεται η προαιρετική δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, προστίθεται στο νερό αναπλήρωσης ίζημα στην αρχική συγκέντρωση (μεταξύ 0,01 και 1 g/l). Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής με εναιώρημα στερεών ιζήματος, έχει σημασία να διατηρείται το σύστημα σε πλήρη διασπορά και κατά τη διάρκεια της ανανέωσης του νερού και ο χρόνος παραμονής να είναι ο ίδιος για τα στερεά και για το νερό, διότι, στην αντίθετη περίπτωση, δεν θα υφίσταται πλέον η επιδιωκόμενη ομοιότητα με ομοιογενές υδατικό σύστημα χωρίς καθορισμένες φάσεις. Για το λόγο αυτό, όταν εφαρμόζεται η ημισυνεχής διαδικασία, είναι προτιμότερο να επιλέγεται αρχική συγκέντρωση εναιωρούμενου ιζήματος στο χαμηλότερο άκρο της καθορισμένης περιοχής.

Η προδιαγραφή για την προσθήκη ελεγχόμενης ουσίας συνεπάγεται ότι δεν σημειώνεται υπέρβαση της αρχικής συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας με τη μερική ανανέωση του εναιωρήματος δοκιμής και, ως εκ τούτου, αποφεύγεται η προσαρμογή που διαπιστώνεται συχνά με υψηλές συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας. Δεδομένου ότι η διαδικασία περιλαμβάνει και επανεποφθαλμισμό και συμπλήρωση των εξαντληθέντων θρεπτικών στοιχείων και πρωτευόντων υποστρωμάτων, η μικροβιακή ποικιλότητα αποκαθίσταται και η διάρκεια της δοκιμής μπορεί να παραταθεί θεωρητικά επ'άπειρον. Αξίζει να σημειωθεί ότι, όταν εφαρμόζεται η ημισυνεχής διαδικασία, η υπολειμματική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να διορθωθεί για να ληφθούν υπόψη οι προστιθέμενες και αφαιρούμενες ποσότητες ελεγχόμενης ουσίας σε κάθε ανανέωση. Στις περιπτώσεις ελάχιστης ρόφησης της ένωσης, μπορεί να χρησιμοποιείται αδιακρίτως είτε η συνολική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας είτε η συγκέντρωση της διαλελυμένης ουσίας. Η ρόφηση είναι αμελητέα (< 5 %) υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες (0,1-1 g στερεών/l) για ουσίες με log Kow < 3 (ισχύει για ουδέτερες, λιπόφιλες ενώσεις). Αυτό επεξηγείται με το ακόλουθο παράδειγμα υπολογισμού. Χονδρικά, 0,1 g/l στερεών αντιστοιχεί σε 10 mg άνθρακα ανά λίτρο (κλάσμα άνθρακα, f_C = 0,01). Εάν:

Log K_{ow} (της ελεγχόμενης ουσίας) = 3

K_{oc} = 0,42 x K_{ow}

Συντελεστής κατανομής, $K_d = f_C \times K_{oc}$,

τότε, το διαλελυμένο κλάσμα της συνολικής συγκέντρωσης (C-νερού (C_w)/C-συνολικό (C_t) ισούται με:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Προσάρτημα 3

Προσδιορισμός του $^{14}CO_2$

Έμμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$

Για μετρήσεις καθημερινής πρακτικής και εφόσον η ελεγχόμενη ουσία δεν είναι πτητική και δεν μετατρέπεται σε πτητικά προϊόντα μετατροπής, η άμεση μέθοδος αποτελεί, κατά κανόνα, την ταχύτερη και ακριβέστερη μέθοδο προσδιορισμού. Αδιήθητα δείγματα όγκου 5 ml, επί παραδείγματι, μεταφέρονται σε φιαλίδια σπινθηρισμού. Η ενδεδειγμένη αρχική ραδιενέργεια των δειγμάτων κυμαίνεται μεταξύ 5 000 dpm και 10 000 dpm (80-170 Bq), ενώ η ελάχιστη αρχική ραδιενέργεια είναι περίπου 1 000 dpm. Το CO_2 θα πρέπει να απομακρυνθεί μετά από οξίνιση έως pH 2-3 με 1-2 σταγόνες πυκνού H_3PO_4 ή HCl. Η απομάκρυνση του CO_2 μπορεί να επιτευχθεί με διοχέτευση φυσαλίδων αέρα επί μισή έως μία ώρα περίπου. Άλλος τρόπος είναι η ζωηρή ανατάραξη των φιαλιδίων επί 1-2 ώρες (επί παραδείγματι στη συσκευή ανατάραξης μικροτριβιλίων) ή ηπιότερη ανατάραξη επί μία νύκτα. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας απομάκρυνσης του CO_2 πρέπει να ελέγχεται (παρατείνοντας τη διάρκεια του αερισμού ή της ανατάραξης). Στη συνέχεια, προστίθεται υγρό σπινθηρισμού, κατάλληλο για την απαρίθμηση σε υδάτινα δείγματα, το δείγμα ομοιογενοποιείται σε αναδευτήρα περιδίνισης και η ραδιενέργεια προσδιορίζεται με απαρίθμηση υγρού σπινθηρισμού, αφού αφαιρεθεί η ραδιενέργεια υποβάθρου που διαπιστώθηκε κατά τη δοκιμή με τυφλούς μάρτυρες (F_B). Εφόσον το νερό δοκιμής δεν έχει ιδιαίτερα έντονο χρώμα ή υψηλή συγκέντρωση σωματιδίων, τα δείγματα παρουσιάζουν κανονικά ομοιόμορφη αναχαίτιση και αρκεί η διόρθωση για την αναχαίτιση με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου. Σε περίπτωση που το νερό δοκιμής έχει έντονο χρώμα, μπορεί να χρειαστεί διόρθωση για την αναχαίτιση με χρήση εσωτερικού προτύπου. Εάν η συγκέντρωση των σωματιδίων είναι υψηλή, ενδέχεται να μην είναι δυνατόν να επιτευχθεί ομοιογένεια του διαλύματος ή της πηκτής ή να υπάρχει μεγάλη διαφορά αναχαίτισης μεταξύ των δειγμάτων. Στην περίπτωση αυτή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος απαρίθμησης που περιγράφεται κατωτέρω για τους πολτούς δοκιμής. Όταν πρόκειται για δοκιμή με εναιώρημα ιζήματος, μπορεί να διενεργηθεί έμμεση μέτρηση του $^{14}CO_2$, λαμβάνοντας ομοιογενές δείγμα όγκου 10 ml από το υδατικό εναιώρημα δοκιμής και διαχωρίζοντας τις φάσεις με φυγοκέντριση σε κατάλληλη ταχύτητα (π.χ. 40 000 m/s^2 επί 15 λεπτά). Η υδατική φάση υποβάλλεται κατόπιν στη διαδικασία που περιγράφεται ανωτέρω. Η ραδιενέργεια του ^{14}C στη σωματιδιακή φάση (POA) προσδιορίζεται σχηματίζοντας νέο εναιώρημα του ιζήματος σε μικρό όγκο απεσταγμένου νερού, το οποίο μεταφέρεται σε φιαλίδια σπινθηρισμού, όπου προστίθεται υγρό σπινθηρισμού ώστε να σχηματιστεί πηκτή (διατίθενται για το σκοπό αυτό ειδικά υγρά σπινθηρισμού). Ανάλογα με το είδος των σωματιδίων (π.χ. περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό), μπορεί να είναι εφικτή η διάσπαση του δείγματος με διαλύτη ιστών επί μία νύχτα και, στη συνέχεια, η ομοιογενοποίησή του με τη βοήθεια αναδευτήρα περιδίνισης πριν προστεθεί το υγρό σπινθηρισμού. Εναλλακτικά, η POA μπορεί να προσδιοριστεί με καύση σε περίσσεια οξυγόνου χρησιμοποιώντας ένα μέσο οξείδωσης του δείγματος. Κατά την απαρίθμηση, πρέπει να περιλαμβάνονται πάντα εσωτερικά πρότυπα, ενώ ενδέχεται να χρειαστούν διορθώσεις για την αναχαίτιση με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου για κάθε επιμέρους δείγμα.

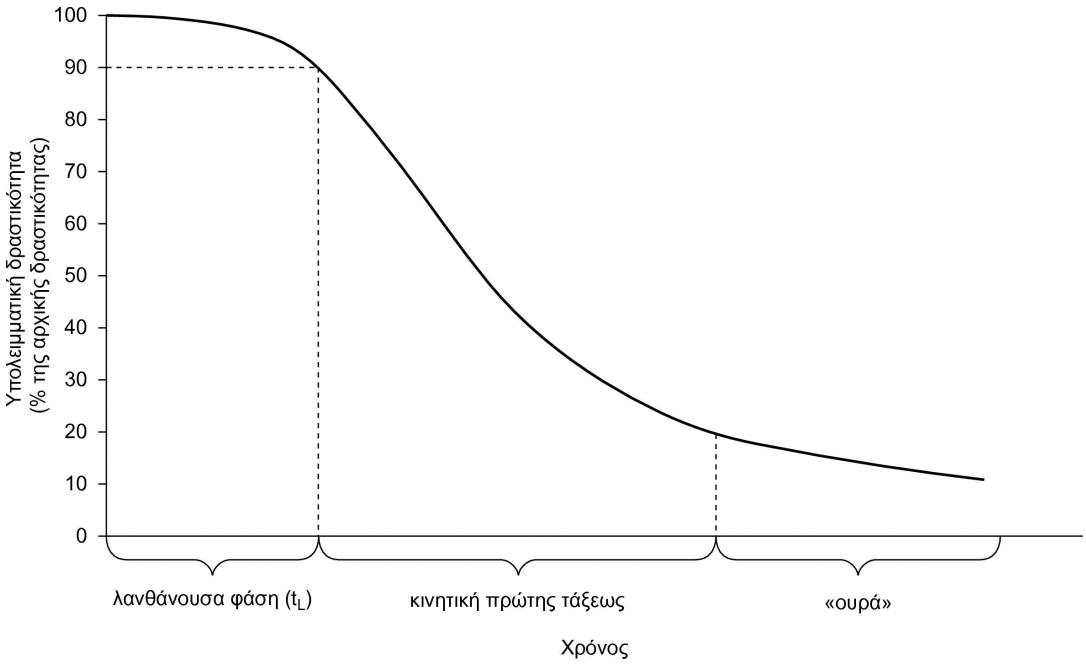
Άμεσος προσδιορισμός του $^{14}CO_2$

Εάν εκτελείται άμεση μέτρηση του εκλυόμενου $^{14}CO_2$, απαιτείται προετοιμασία περισσοτέρων φιαλών στην αρχή της δοκιμής, συλλογή του περιεχομένου των δοκιμαστικών φιαλών σε κάθε σημείο μέτρησης μετά από οξίνισή του έως pH 2-3 και συλλογή του $^{14}CO_2$ σε εσωτερικό (τοποθετούμενο σε κάθε δοκιμαστική φιάλη στην αρχή της δοκιμής) ή εξωτερικό σύστημα απορρόφησης. Για τον σκοπό αυτό είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν άλκαλι (π.χ. διάλυμα NaOH 1 N, ή σφαιρίδιο NaOH), αιθανολαμίνη ή αιθανολαμινούχο υλικό, καθώς και τα διαθέσιμα στο εμπόριο απορροφητικά υλικά. Οι χρησιμοποιούμενες για τον άμεσο προσδιορισμό του $^{14}CO_2$ φιάλες πρέπει να είναι πωματισμένες, επί παραδείγματι, με διαφράγματα από βουτυλοκαουτσούκ.

▼**M1**

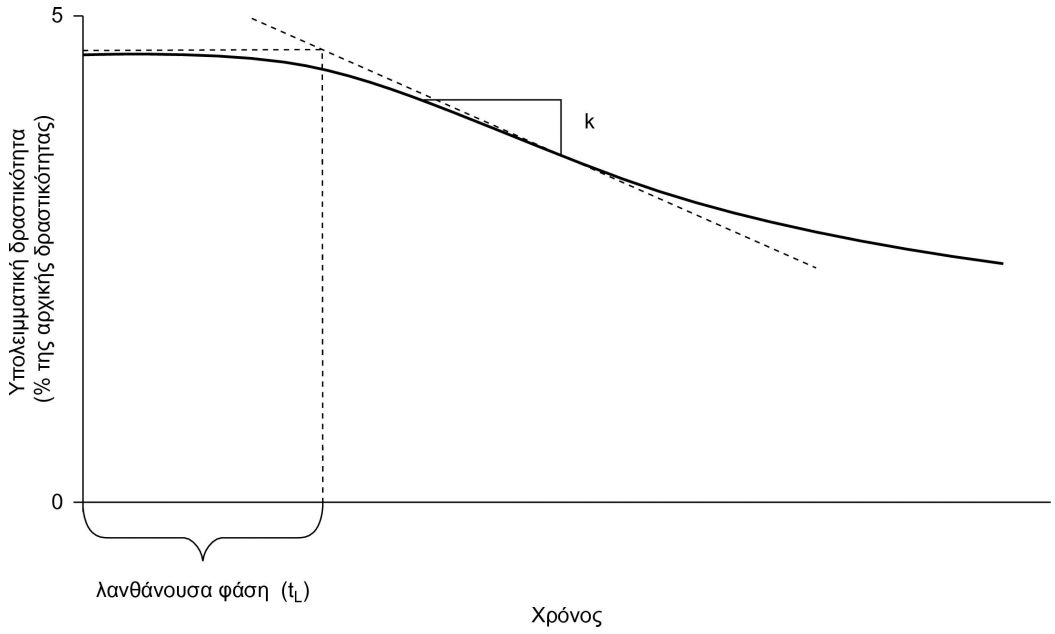
Σχήμα 1α

Παράδειγμα αριθμητικού διαγράμματος δεδομένων (υπολειμματική δραστικότητα ως προς το χρόνο)



Σχήμα 1β

Παράδειγμα ημιλογαριθμικού διαγράμματος δεδομένων (λογάριθμος της υπολειμματικής δραστικότητας ως προς το χρόνο)



▼M1

Γ.26. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *LEMNA* SP.

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 221 (2006) του ΟΟΣΑ (1). Οι αρχές της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) συμφώνησαν γενικά ότι η δοκιμή σε *Lemna* αποτελεί κατάλληλη εναλλακτική επιλογή αντί της δοκιμής σε φύκη για τις ουσίες έντονου χρώματος (2)(3).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών προορίζεται για την εκτίμηση της τοξικότητας ουσιών για τα υδρόβια φυτά των γλυκών υδάτων του γένους *Lemna* (κοινώς, λέμνα ή φακή του νερού). Η μέθοδος βασίζεται στις υφιστάμενες κατευθυντήριες γραμμές (4)(5)(6)(7)(8)(9), αλλά περιλαμβάνει τροποποιήσεις των αντίστοιχων μεθόδων, οι οποίες αποτυπώνουν τα αποτελέσματα πρόσφατων ερευνητικών εργασιών και διαβουλεύσεων για ορισμένα ζητήματα καίριας σημασίας. Η προτεινόμενη μέθοδος επικυρώθηκε με διεθνή κυκλική δοκιμή (ring-test) (10).

Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφεται η διεξαγωγή δοκιμής τοξικότητας με χρήση των ειδών *Lemna gibba* και *Lemna minor*, που έχουν μελετηθεί εκτενώς και αποτελούν το αντικείμενο των προαναφερόμενων προτύπων. Η συστηματική κατάταξη του φυτού *Lemna* spp. είναι δύσκολη, διότι περιπλέκεται από την ύπαρξη πληθώρας φαινοτύπων. Παρόλο που μπορεί να παρουσιαστεί γενετική μεταβλητότητα της απόκρισης της λέμνας σε τοξικούς παράγοντες, τα σχετικά με αυτό το αίτιο μεταβλητότητας δεδομένα δεν επαρκούν, προς το παρόν, ώστε να υποδειχθεί η χρήση συγκεκριμένου κλώνου κατά την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου. Σημειωτέον ότι η δοκιμή δεν διεξάγεται με αξενικές (χωρίς παρουσία ξένων οργανισμών) καλλιέργειες, λαμβάνονται όμως μέτρα σε διάφορα στάδια της διαδικασίας δοκιμής για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης από άλλους οργανισμούς.

Περιγράφεται λεπτομερώς η διεξαγωγή της δοκιμής με ανανέωση (ημιστατικό και συνεχές σύστημα) και χωρίς ανανέωση (στατικό σύστημα) του διαλύματος δοκιμής. Ανάλογα με τους στόχους της δοκιμής και τις απαιτήσεις των κανονιστικών ρυθμίσεων, συνιστάται να εξετάζεται το ενδεχόμενο εφαρμογής των ημιστατικών και των συνεχών τεχνικών, π.χ. στην περίπτωση των ουσιών που εξαφανίζονται ταχέως από το διάλυμα, λόγω εξάτμισης, φωτοαποικοδόμησης, καθίζησης ή βιοαποικοδόμησης. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στη δημοσίευση (11).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί και συντμήσεις:

Βιομάζα: το ξηρό βάρος της ζώσας ύλης την οποία περιέχει ένας πληθυσμός. Στην παρούσα δοκιμή, μετρώνται συνήθως υποκατάστατα της βιομάζας, όπως ο αριθμός θαλλών ή η θαλλική επιφάνεια. Ως εκ τούτου, ο όρος βιομάζα αναφέρεται και σε αυτά τα υποκατάστατα μέτρα.

Χλώρωση: ο κίτρινος χρωματισμός του θαλλικού ιστού.

Κλώνος: οργανισμός ή κύτταρο που δημιουργείται με αγενή πολλαπλασιασμό από ένα μόνο άτομο. Συνεπώς, τα μέλη του ίδιου κλώνου είναι γενετικώς πανομοιότυπα.

Αποικία: συσσωμάτωμα μητρικών και θυγατρικών θαλλών (συνήθως 2 έως 4), συνδεδεμένων μεταξύ τους. Μερικές φορές, αναφέρεται ως φυτό.

▼M1

EC_x: η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, διαλελυμένης στο υλικό δοκιμής, η οποία προκαλεί μείωση της ανάπτυξης της λέμνας κατά x % (π.χ. 50 %) εντός της δηλούμενης περιόδου έκθεσης (πρέπει να αναφέρεται επακριβώς, εάν διαφέρει από την πλήρη ή κανονική διάρκεια της δοκιμής). Για να δηλώνεται σαφώς αν η τιμή EC έχει προκύψει από τον ρυθμό ανάπτυξης ή από την απόδοση, χρησιμοποιούνται τα σύμβολα «E_rC» και «E_yC», αντίστοιχα, ακολουθούμενα από τη μεταβλητή που μετρήθηκε, π.χ. E_rC (αριθμός θαλλών).

Συνεχής δοκιμή: η δοκιμή στην οποία τα διαλύματα δοκιμής αντικαθίστανται συνεχώς.

Θαλλός: ατομική/μεμονωμένη «φυλλοειδής» δομή του φυτού λέμνα. Πρόκειται για τη μικρότερη μονάδα, δηλαδή άτομο, με ικανότητα αναπαραγωγής.

Κυφότητα: οι θαλλοί που εμφανίζουν εξόγκωμα ή διόγκωση.

Ανάπτυξη: η αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής — αριθμός θαλλών, ξηρό βάρος, υγρό (νωπό) βάρος ή θαλλική επιφάνεια— στη διάρκεια της δοκιμής.

Ρυθμός ανάπτυξης (**μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης**): η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας κατά την περίοδο έκθεσης.

Κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC, από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων Lowest Observed Effect Concentration): η χαμηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση, στην οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης (με $p < 0,05$) υπό την επίδραση της ουσίας, σε σύγκριση με τον μάρτυρα, εντός δεδομένου χρόνου έκθεσης. Ωστόσο, όλες οι ελεγχόμενες συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τη LOEC πρέπει να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση όπου δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Μετρούμενες μεταβλητές: κάθε είδους μεταβλητή που μετράται, προκειμένου να εκφραστεί το τελικό σημείο της δοκιμής με χρήση μίας ή περισσότερων διαφορετικών μεταβλητών απόκρισης. Στην παρούσα μέθοδο, μετρούμενες μεταβλητές είναι ο αριθμός θαλλών, η θαλλική επιφάνεια, το υγρό βάρος και το ξηρό βάρος.

Μονοκαλλιέργεια: καλλιέργεια με ένα μόνο είδος φυτού.

Νέκρωση: νεκρός (δηλαδή λευκός ή διαποτισμένος με νερό) θαλλικός ιστός.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων No Observed Effect Concentration): η αμέσως μικρότερη από τη LOEC ελεγχόμενη συγκέντρωση.

Φαινότυπος: τα αντιληπτά χαρακτηριστικά ενός οργανισμού, τα οποία καθορίζονται από την αλληλεπίδραση των γονιδίων του με το περιβάλλον του.

Μεταβλητές απόκρισης: μεταβλητές για την εκτίμηση της τοξικότητας, οι οποίες προκύπτουν, με διάφορες μεθόδους υπολογισμού, από τις μετρούμενες μεταβλητές που περιγράφουν τη βιομάζα. Στην παρούσα μέθοδο, ο ρυθμός ανάπτυξης και η απόδοση είναι μεταβλητές απόκρισης που προκύπτουν από μετρούμενες μεταβλητές, όπως ο αριθμός θαλλών, η θαλλική επιφάνεια, το υγρό βάρος ή το ξηρό βάρος.

Ημιστατική δοκιμή (ανανέωσης): η δοκιμή στη διάρκεια της οποίας το διάλυμα δοκιμής αντικαθίσταται σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Στατική δοκιμή: η δοκιμή στη διάρκεια της οποίας δεν ανανεώνεται το διάλυμα δοκιμής.

▼M1

Τελικό σημείο της δοκιμής: περιγράφει, ως στόχο της δοκιμής, τον γενικό παράγοντα που θα μεταβληθεί υπό την επίδραση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε σχέση με τον μάρτυρα. Στην παρούσα μέθοδο, τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή (παρεμπόδιση) της ανάπτυξης, η οποία μπορεί να εκφραστεί με διάφορες μεταβλητές απόκρισης, βασιζόμενες σε μία ή περισσότερες μετρούμενες μεταβλητές.

Υλικό δοκιμής: το πλήρες συνθετικό θρεπτικό υλικό, στο οποίο αναπτύσσονται τα φυτά της δοκιμής, όταν εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία. Η ελεγχόμενη ουσία είναι κατά κανόνα διαλελυμένη στο υλικό δοκιμής.

Απόδοση: ισούται με την τιμή της μετρούμενης μεταβλητής που εκφράζει τη βιομάζα, στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον την τιμή της ίδιας μεταβλητής στην αρχή της περιόδου έκθεσης.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Λογαριθμικές (εκθετικές) καλλιέργειες φυτών του γένους *Lemna* αφήνονται να αναπτυχθούν ως μονοκαλλιέργειες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας για περίοδο επτά ημερών. Σκοπός τη δοκιμής είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιδράσεων της ουσίας στη βλαστητική αύξηση κατά την ανωτέρω περίοδο, με βάση εκτιμήσεις των επιλεγμένων μετρούμενων μεταβλητών. Ο αριθμός θαλλών είναι η πρωταρχική μετρούμενη μεταβλητή. Μετράται επίσης τουλάχιστον μία ακόμη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή ορισμένες ουσίες είναι δυνατόν να έχουν πολύ μεγαλύτερη επίδραση σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές απ' όση στον αριθμό θαλλών. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιδράσεων της ουσίας, συγκρίνεται η ανάπτυξη στα διαλύματα δοκιμής με εκείνη των μαρτύρων και προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %), η οποία εκφράζεται ως EC_x (π.χ. EC_{50}).

Το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, εκφραζόμενη ως λογαριθμική αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης) στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Από τους μέσους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης που καταγράφονται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως E_rC_x (π.χ. E_rC_{50}).

Μία επιπλέον μεταβλητή απόκρισης που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι η απόδοση, η οποία ενδέχεται να απαιτείται για τη συμμόρφωση με ειδικές κανονιστικές απαιτήσεις σε ορισμένες χώρες. Η απόδοση ορίζεται ως η διαφορά των μετρούμενων μεταβλητών στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον τις μετρούμενες μεταβλητές στην αρχή της περιόδου αυτής. Από την απόδοση που καταγράφεται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της απόδοσης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως E_yC_x (π.χ. EyC_{50}).

Επιπροσθέτως, μπορούν να προσδιοριστούν στατιστικά η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC).

1.4. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

Θα πρέπει να υπάρχει αναλυτική μέθοδος επαρκούς ευαισθησίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στο υλικό δοκιμής.

▼M1

Στις σχετικές με την ελεγχόμενη ουσία πληροφορίες, που μπορεί να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής, περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η υδατοδιαλυτότητα, η σταθερότητα στο νερό και στο φως, οι σταθερές pK_a και P_{ow}, η τάση ατμών και η βιοαποικοδομησιμότητα. Η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της σταθεράς του νόμου του Henry, η οποία δείχνει αν είναι πιθανόν να σημειωθούν σημαντικές απώλειες της ελεγχόμενης ουσίας στη διάρκεια της δοκιμής. Με τον τρόπο αυτό κρίνεται ευκολότερα αν πρέπει να ληφθούν ιδιαίτερα μέτρα για τον έλεγχο των εν λόγω απωλειών. Σε περίπτωση που τα στοιχεία για τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας είναι αβέβαια, συνιστάται να εκτιμώνται οι ιδιότητες αυτές στις συνθήκες της δοκιμής, δηλαδή θρεπτικό υλικό και συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή.

Όταν ο έλεγχος του pH του υλικού δοκιμής έχει ιδιαίτερη σημασία, π.χ. στις δοκιμές μετάλλων ή ασταθών στην υδρόλυση ουσιών, συνιστάται η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο θρεπτικό υλικό (βλέπε σημείο 1.7.4, πρώτο εδάφιο). Περαιτέρω καθοδήγηση για τον έλεγχο ουσιών που οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες δυσχεραίνουν τη δοκιμή τους παρέχονται στη δημοσίευση (11).

1.5. ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Είναι δυνατόν να υποβληθούν σε δοκιμή μία ή περισσότερες ουσίες αναφοράς, όπως η 3,5-διχλωρο-φαινόλη που χρησιμοποιήθηκε στη διεθνή κυκλική δοκιμή (10), προκειμένου να ελεγχθεί η διαδικασία δοκιμής. Είναι σκόπιμο να υποβάλλεται η ουσία αναφοράς σε δοκιμή τουλάχιστον ανά εξάμηνο ή, στην περίπτωση των δοκιμών που διεξάγονται με μικρότερη συχνότητα, παράλληλα με τον προσδιορισμό της τοξικότητας της ελεγχόμενης ουσίας.

1.6. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, ο χρόνος διπλασιασμού του αριθμού θαλλών στον μάρτυρα πρέπει να μην υπερβαίνει τις 2,5 ημέρες (60 ώρες), τιμή που αντιστοιχεί περίπου σε επταπλασιασμό σε επτά ημέρες και σε μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης 0,275 ημέρα^{-1}. Με τα υλικά και στις συνθήκες δοκιμής που περιγράφονται στη παρούσα μέθοδο, το κριτήριο αυτό είναι δυνατόν να πληρούται σε στατικό σύστημα δοκιμής (8). Προβλέπεται επίσης ότι θα πληρούται σε συνθήκες ημιστατικής και συνεχούς δοκιμής. Ο υπολογισμός του χρόνου διπλασιασμού παρατίθεται στο σημείο 2.1.

1.7. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

1.7.1. **Εργαστηριακά σκεύη και όργανα**

Όλα τα τεμάχια εξοπλισμού που πρόκειται να έλθουν σε επαφή με τα υλικά δοκιμής πρέπει να είναι κατασκευασμένα από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια και δοκιμές θα πρέπει να καθαρίζονται για την απομάκρυνση των ξένων χημικών ουσιών, οι οποίες θα μπορούσαν να διεισδύσουν στο υλικό δοκιμής, και να είναι στείρα. Τα δοκιμαστικά δοχεία θα πρέπει να έχουν ικανό πλάτος, ώστε οι θαλλοί των διαφόρων αποικιών στα δοχεία μάρτυρες να μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς να αλληλεπικαλύπτονται στο τέλος της δοκιμής. Δεν έχει σημασία αν οι ρίζες αγγίζουν τον πυθμένα των δοκιμαστικών δοχείων, συνιστάται όμως να έχει κάθε δοκιμαστικό δοχείο ελάχιστο βάθος 20 mm και ελάχιστο όγκο 100 ml. Η επιλογή τύπου δοκιμαστικών δοχείων δεν έχει κρίσιμη σημασία, εφόσον πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές. Τα γυάλινα ποτήρια ζέσεως, δοχεία κρυστάλλωσης και τριβλία petri με τις ενδεδειγμένες διαστάσεις έχουν αποδειχθεί όλα κατάλληλα. Τα δοκιμαστικά δοχεία πρέπει να καλύπτονται, ώστε να ελαχιστοποιούνται η εξάτμιση και η συμπτωματική μόλυνση, ταυτόχρονα δε, να είναι δυνατή η αναγκαία ανταλλαγή αέρα. Τα κατάλληλα δοκιμαστικά δοχεία και, ιδίως, τα καλύμματα πρέπει να αποτρέπουν τη σκίαση και τις αλλαγές στα φασματικά χαρακτηριστικά του φωτός.

▼M1

Οι καλλιέργειες και τα δοκιμαστικά δοχεία δεν θα πρέπει να φυλάσσονται μαζί. Ο καλύτερος τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρήση χωριστών θαλάμων, επωαστήρων ή δωματίων ανάπτυξης σε συνθήκες περιβάλλοντος. Ο φωτισμός και η θερμοκρασία πρέπει να μπορούν να ρυθμίζονται και να διατηρούνται σταθερά (βλέπε σημείο 1.7.8).

1.7.2. **Οργανισμός δοκιμής**

Ο οργανισμός που χρησιμοποιείται στην παρούσα δοκιμή είναι είτε το είδος *Lemna gibba* ή το *Lemna minor*. Σύντομες περιγραφές των ειδών λέμνας που έχουν χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές τοξικότητας παρέχονται στο προσάρτημα 1. Το φυτικό υλικό μπορεί να ληφθεί από συλλογή καλλιεργειών, άλλο εργαστήριο ή από το ύπαιθρο. Εάν τα φυτά έχουν συλλεχθεί από το ύπαιθρο, θα πρέπει να διατηρούνται σε καλλιέργεια στο ίδιο θρεπτικό υλικό με εκείνο που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, τουλάχιστον για οκτώ εβδομάδες πριν από τη χρήση τους. Οι υπαίθριοι χώροι από τους οποίους συλλέγονται τα φυτά των αρχικών καλιεργειών πρέπει να είναι απαλλαγμένοι από εμφανείς πηγές μόλυνσης. Ομοίως, εάν τα φυτά έχουν ληφθεί από άλλο εργαστήριο ή από συλλογή καλλιεργειών, θα πρέπει να διατηρούνται για χρονικό διάστημα τουλάχιστον τριών εβδομάδων. Θα πρέπει πάντα να αναφέρονται η πηγή του φυτικού υλικού, καθώς και το είδος και ο κλώνος (εφόσον είναι γνωστός) που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μονοκαλλιέργειες, εμφανώς απαλλαγμένες από μόλυνση από άλλους οργανισμούς, όπως φύκη (άλγες) και πρωτόζωα. Τα υγιή φυτά του είδους *L. minor* συνίστανται από αποικίες που περιλαμβάνουν δύο έως πέντε θαλλούς, ενώ οι υγιείς αποικίες του *L. gibba* είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν έως επτά θαλλούς.

Η ποιότητα και η ομοιομορφία των φυτών που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή επηρεάζουν σημαντικά την έκβασή της και, συνεπώς, πρέπει να επιλέγονται επιμελώς. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά, ταχέως αναπτυσσόμενα φυτά, χωρίς ορατές αλλοιώσεις ούτε αποχρωματισμό (χλώρωση). Οι καλλιέργειες καλής ποιότητας χαρακτηρίζονται από υψηλή συχνότητα εμφάνισης αποικιών με δύο τουλάχιστον θαλλούς. Ο μεγάλος αριθμός μεμονωμένων θαλλών αποτελεί ένδειξη περιβαλλοντικής πίεσης, π.χ. περιορισμός θρεπτικών στοιχείων, και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη δοκιμή φυτικό υλικό από τέτοιες καλλιέργειες.

1.7.3. **Καλλιέργεια**

Για λιγότερο συχνή διατήρηση της καλλιέργειας (π.χ. όταν δεν έχουν προγραμματιστεί δοκιμές σε λέμνα για κάποιο διάστημα), οι καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε συνθήκες ελαττωμένου φωτισμού και ελαττωμένης θερμοκρασίας (4-10 °C). Λεπτομέρειες σχετικά με την καλλιέργεια παρέχονται στο προσάρτημα 2. Τα προφανή σημεία μόλυνσης από φύκη ή άλλους οργανισμούς επιβάλλουν την επιφανειακή αποστείρωση ενός μερικού δείγματος θαλλών λέμνας, ακολουθούμενη από μεταφορά σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό υλικό (βλέπε προσάρτημα 2). Στην περίπτωση αυτή, η υπόλοιπη μολυσμένη καλλιέργεια θα πρέπει να απορρίπτεται.

Τουλάχιστον επτά ημέρες πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, επαρκής αριθμός αποικιών μεταφέρονται ασηπτικά σε στείρο θρεπτικό υλικό πρόσφατης παρασκευής και καλλιεργούνται για 7-10 ημέρες στις συνθήκες της δοκιμής.

1.7.4. **Υλικό δοκιμής**

Συνιστώνται διαφορετικά θρεπτικά υλικά για το *Lemna minor* και το *Lemna gibba*, τα οποία περιγράφονται κατωτέρω. Θα πρέπει να μελετάται με προσοχή η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο υλικό δοκιμής (MOPS [4-μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ, αριθ. CAS: 1132-61-2, αριθ. EINECS: 214-478-5] στο υλικό για το *L. minor* και $NaHCO_3$ στο υλικό για το *L. gibba*), εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι ενδέχεται να αντιδράσει με την ελεγχόμενη ουσία και να επηρεάσει την έκφραση της τοξικότητάς της. Αποδεκτό είναι, επίσης, το υλικό Steinberg (12), εφόσον πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας.

▼M1

Για την καλλιέργεια και τις δοκιμές σε *L. minor* συνιστάται, τροποποιημένο, το πρότυπο θρεπτικό υλικό για λέμνα του Σουηδικού Ινστιτούτου Προτύπων (SIS). Η σύσταση του υλικού αυτού παρατίθεται στο προσάρτημα 3.

Για την καλλιέργεια και τις δοκιμές σε *L. gibba* συνιστάται το θρεπτικό υλικό 20X — AAP που περιγράφεται στο προσάρτημα 3.

Κατάλληλο για το είδος *L. minor* είναι, επίσης, το περιγραφόμενο στο προσάρτημα 3 υλικό Steinberg, το οποίο, ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το *L. gibba*, εφόσον πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας.

1.7.5. **Διαλύματα δοκιμής**

Τα διαλύματα δοκιμής παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση μητρικών διαλυμάτων. Τα μητρικά διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας παρασκευάζονται, κατά κανόνα, με διάλυση της ουσίας στο θρεπτικό υλικό.

Η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής της ελεγχόμενης ουσίας θα πρέπει κανονικά να υπερβαίνει την υδατοδιαλυτότητά της στις συνθήκες της δοκιμής. Σημειωτέον, όμως, ότι τα φυτά *Lemna* spp. επιπλέουν στην επιφάνεια και είναι δυνατόν να εκτεθούν σε ουσίες που συσσωρεύονται στην επιφάνεια επαφής νερού-αέρα (π.χ. δυσδιάλυτες στο νερό ή υδρόφοβες ή επιφανειοδραστικές ουσίες). Στις περιπτώσεις αυτές, η έκθεση οφείλεται σε άλλες ύλες πλην των διαλελυμένων, οι δε συγκεντρώσεις δοκιμής μπορούν να υπερβαίνουν την υδατοδιαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της. Προκειμένου για ελεγχόμενες ουσίες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να παρασκευαστεί πυκνό μητρικό ή κολλοειδές διάλυμα της ουσίας με τη βοήθεια οργανικού διαλύτη ή μέσου διασποράς, ώστε να διευκολυνθεί η προσθήκη ακριβών ποσοτήτων της ελεγχόμενης ουσίας στο υλικό δοκιμής και να υποβοηθηθούν διασπορά και η διάλυσή της. Θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για τη αποφυγή της χρήσης τέτοιων υλικών. Η χρήση βοηθητικών διαλυτών ή μέσων διασποράς δεν θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα φυτοτοξικότητα. Για παράδειγμα, μεταξύ των διαλυτών ευρείας χρήσης που δεν προκαλούν φυτοτοξικότητα σε συγκεντρώσεις έως 100 $\mu l \cdot l^{-1}$ περιλαμβάνονται η ακετόνη και το διμεθυλοφορμαμίδιο. Σε περίπτωση χρήσης διαλύτη ή μέσου διασποράς, η τελική του συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται και να διατηρείται σε ελάχιστα επίπεδα ($\leq$ 100 $\mu l \cdot l^{-1}$), να είναι δε η ίδια σε όλες τις ομάδες αγωγής και μάρτυρες. Περαιτέρω καθοδήγηση για τη χρήση μέσων διασποράς παρέχεται στη δημοσίευση (11).

1.7.6. **Ομάδες δοκιμής και μάρτυρες**

Η προηγούμενη γνώση της τοξικότητας της ελεγχόμενης ουσίας για τη λέμνα, π.χ. μέσω δοκιμής εύρεσης πεδίου τιμών, διευκολύνει την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής. Στην οριστική δοκιμή τοξικότητας, θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής, διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο. Ο λόγος προόδου θα πρέπει, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 3,2, αλλά επιτρέπεται να χρησιμοποιείται υψηλότερη τιμή, εάν η καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης είναι επίπεδη. Εάν έχουν χρησιμοποιηθεί λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται. Σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία πανομοιότυπα δοχεία (replicates).

Στον καθορισμό της σειράς των συγκεντρώσεων δοκιμής (για τη δοκιμή εύρεσης πεδίου τιμών ή/και τη οριστική δοκιμή τοξικότητας), θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

▼M1

— Για τον προσδιορισμό μιας EC_x, η τιμή της θα πρέπει να περικλείεται από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, ώστε να εξασφαλίζεται η ενδεδειγμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Εάν, λόγου χάριν, πρόκειται να εκτιμηθεί η EC_{50}, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή EC_{50}. Εάν η τιμή EC_{50} βρίσκεται εκτός του εύρους των συγκεντρώσεων δοκιμής, τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης θα είναι μεγάλα, με αποτέλεσμα να καθίσταται ενδεχομένως αδύνατη η ορθή αξιολόγηση της στατιστικής προσαρμογής με το μοντέλο.

— Εάν το ζητούμενο είναι η εκτίμηση της LOEC/NOEC, η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, ώστε η ανάπτυξη να μην είναι σημαντικά μικρότερη απ' ότι στον μάρτυρα. Επιπλέον, η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως υψηλή, ώστε η ανάπτυξη να είναι σημαντικά μικρότερη απ' ότι στον μάρτυρα. Σε αντίθετη περίπτωση, η δοκιμή θα πρέπει να επαναληφθεί με διαφορετικό εύρος συγκεντρώσεων (εκτός εάν η υψηλότερη συγκέντρωση δεν υπερβαίνει το όριο διαλυτότητας ή το απαιτούμενο ανώτατο όριο συγκέντρωσης, π.χ. 100 $mg \cdot l^{-1}$).

Κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει μάρτυρες, που συνίστανται σε θρεπτικό υλικό, αριθμό θαλλών και αποικιών, συνθήκες περιβάλλοντος και διαδικασίες ίδια με εκείνα των δοχείων αγωγής, αλλά χωρίς την ελεγχόμενη ουσία. Εάν χρησιμοποιείται βοηθητικός διαλύτης ή μέσο διασποράς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πρόσθετη αγωγή μάρτυρας με τον διαλύτη/μέσο διασποράς στην ίδια συγκέντρωση με τη χρησιμοποιούμενη στα δοχεία που περιέχουν την ελεγχόμενη ουσία. Το πλήθος των δοχείων μαρτύρων (και των δοχείων με διαλύτη, εάν έχει εφαρμογή) πρέπει να είναι τουλάχιστον ίσο και, στην ιδανική περίπτωση, διπλάσιο από το πλήθος των δοχείων που χρησιμοποιούνται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής.

Εάν δεν απαιτείται προσδιορισμός της NOEC, ο σχεδιασμός της δοκιμής είναι δυνατόν να τροποποιηθεί, ώστε να αυξηθεί το πλήθος των συγκεντρώσεων και να μειωθεί το πλήθος των δοχείων ανά συγκέντρωση. Ωστόσο, τα δοχεία μάρτυρες πρέπει να είναι τουλάχιστον τρία.

1.7.7. **Έκθεση**

Αποικίες αποτελούμενες από 2 έως 4 ορατούς θαλλούς μεταφέρονται ασηπτικά από την καλλιέργεια εμβολιασμού (ενοφθαλμισμού) στα δοκιμαστικά δοχεία με τυχαιοποιημένη κατανομή μεταξύ των δοχείων. Κάθε δοκιμαστικό δοχείο θα πρέπει να περιέχει συνολικά 9 έως 12 fronds. Ο αριθμός των θαλλών και αποικιών θα πρέπει να είναι ο ίδιος σε όλα τα δοχεία. Η εμπειρία από την παρούσα μέθοδο, καθώς και τα δεδομένα κυκλικής δοκιμής δείχνουν ότι ο τριπλός προσδιορισμός ανά αγωγή, κατά τον οποίο κάθε δοχείο περιέχει αρχικά 9 έως 12 θαλλούς, αρκεί για την ανίχνευση διαφορών στην ανάπτυξη της τάξεως του 4 έως 7 %, όταν η αναστολή της υπολογίζεται με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης (10 έως 15 %, όταν υπολογίζεται με βάση την απόδοση) μεταξύ των ομάδων αγωγής (10).

Απαιτείται τυχαιοποιημένος σχεδιασμός για τη θέση των δοκιμαστικών δοχείων στον επωαστήρα, ώστε να ελαχιστοποιείται η επιρροή των χωρικών διαφορών ως προς τη φωτεινή ένταση ή τη θερμοκρασία. Απαιτείται επίσης σχεδιασμός καθ' ομάδες (blocked design) ή τυχαιοποιημένη επανατοποθέτηση των δοχείων μετά τις παρατηρήσεις (ή συχνότερη αλλαγή θέσης).

▼M1

Εάν από προκαταρτική δοκιμή σταθερότητας έχει προκύψει ότι δεν είναι δυνατόν να διατηρηθεί η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας (δηλαδή η μετρούμενη συγκέντρωση μειώνεται κάτω του 80 % της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής (7 ημέρες), συνιστάται ημιστατικό σύστημα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, οι αποικίες θα πρέπει να εκτίθενται σε πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής και μάρτυρα τουλάχιστον δύο φορές κατά τη δοκιμή (π.χ. την $3^η$ και την $5^η$ ημέρα). Η συχνότητα έκθεσης στο πρόσφατα παρασκευασμένο υλικό εξαρτάται από τη σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας· ενδέχεται να χρειαστεί μεγαλύτερη συχνότητα για τη διατήρηση σχεδόν σταθερών συγκεντρώσεων εξαιρετικά ασταθών ή πτητικών ουσιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτηθεί συνεχής διαδικασία (11)(13).

Το σενάριο έκθεσης μέσω εφαρμογής στο φύλλωμα (ψεκασμός) δεν καλύπτεται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών, βλέπε αντ' αυτής δημοσίευση (14).

1.7.8. **Συνθήκες επώασης**

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται συνεχής φωτισμός με θερμό ή ψυχρό λευκό φως φθορισμού, ώστε να εξασφαλίζεται φωτεινή ένταση η οποία επιλέγεται από το πεδίο τιμών 85-135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (ισοδύναμο με 6 500-10 000 lux), μετρούμενη σε φωτοσυνθετικά ενεργό μήκος κύματος της ακτινοβολίας (400-700 nm), σε σημεία που βρίσκονται στην ίδια απόσταση από τη φωτεινή πηγή όπως οι θαλλοί της λέμνας. Οι τυχόν διαφορές από την επιλεγμένη φωτεινή ένταση στην επιφάνεια όπου διεξάγεται η δοκιμή δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το ± 15 %. Η μέθοδος ανίχνευσης και μέτρησης του φωτός, ιδίως δε ο τύπος του αισθητήρα, επηρεάζουν τη μετρούμενη τιμή. Οι σφαιρικοί αισθητήρες (που αποκρίνονται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω και κάτω από το επίπεδο μέτρησης) και οι αισθητήρες συνημιτόνου (που αποκρίνονται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω από το επίπεδο μέτρησης) προτιμώνται έναντι των αισθητήρων μονής κατεύθυνσης και παρέχουν μεγαλύτερες ενδείξεις για τις πολυσημειακές φωτεινές πηγές του είδους που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο.

Η θερμοκρασία στα δοκιμαστικά δοχεία θα πρέπει να είναι 24 ± 2 °C. Το pH του υλικού μάρτυρα δεν θα πρέπει να αυξάνεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδα στη διάρκεια της δοκιμής. Ωστόσο, οι αποκλίσεις πέραν της 1,5 μονάδας δεν ακυρώνουν τη δοκιμή, εφόσον είναι δυνατόν να αποδειχθεί ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητάς της. Πρέπει να αποδίδεται μεγαλύτερη προσοχή στη μεταβολή του pH σε ειδικές περιπτώσεις, όπως κατά τη δοκιμή ασταθών ουσιών ή μετάλλων. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στη δημοσίευση (11).

1.7.9. **Διάρκεια**

Η δοκιμή τερματίζεται 7 ημέρες μετά τη μεταφορά των φυτών στα δοκιμαστικά δοχεία.

1.7.10. **Μετρήσεις και αναλυτικοί προσδιορισμοί**

Στην αρχή της δοκιμής μετράται και καταγράφεται ο αριθμός θαλλών, με μέριμνα ώστε να καταμετρώνται οι προεξέχοντες ευδιάκριτοι θαλλοί. Οι αριθμοί θαλλών που φαίνονται φυσιολογικοί ή αφύσικοι πρέπει να προσδιορίζονται στην αρχή της δοκιμής, τουλάχιστον ανά τρεις ημέρες κατά την περίοδο έκθεσης (δηλαδή τουλάχιστον δύο φορές στη διάρκεια της επταήμερης περιόδου) και τουλάχιστον στο τέλος της δοκιμής. Οι αλλαγές στην ανάπτυξη των φυτών, π.χ. μεταβολή του μεγέθους και της εμφάνισης των θαλλών, ενδείξεις νέκρωσης, χλώρωσης ή κυφότητας, θραύση ή απώλεια πλευστότητας των αποικιών, καθώς και στο μήκος και στην όψη των ριζών πρέπει να σημειώνονται. Θα πρέπει επίσης να σημειώνονται τα σημαντικά χαρακτηριστικά του υλικού δοκιμής (π.χ. παρουσία αδιάλυτων υλικών, ανάπτυξη φυκών στο δοκιμαστικό δοχείο).

▼**M1**

Επιπλέον της καταμέτρησης των θαλλών κατά τη δοκιμή, εκτιμώνται οι επιδράσεις της ελεγχόμενης ουσίας και σε μία (ή περισσότερες) από τις ακόλουθες μετρούμενες μεταβλητές:

i) συνολική θαλλική επιφάνεια,

ii) ξηρό βάρος,

iii) υγρό βάρος.

Η συνολική θαλλική επιφάνεια παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να προσδιοριστεί σε κάθε δοχείο δοκιμής και μάρτυρα στην αρχή, στη διάρκεια και στο τέλος της δοκιμής. Το ξηρό ή το υγρό βάρος θα πρέπει να προσδιορίζεται στη αρχή της δοκιμής, σε δείγμα της καλλιέργειας εμβολιασμού το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό του υλικού που χρησιμοποιήθηκε για την εκκίνηση της δοκιμής, καθώς και στο τέλος της δοκιμής στο φυτικό υλικό κάθε δοχείου δοκιμής και μάρτυρα. Εάν δεν μετράται η θαλλική επιφάνεια, προτιμάται το ξηρό βάρος έναντι του υγρού.

Η συνολική θαλλική επιφάνεια, το ξηρό βάρος και το υγρό βάρος μπορούν να προσδιοριστούν ως εξής:

i) *Συνολική θαλλική επιφάνεια*: Η συνολική επιφάνεια των θαλλών όλων των αποικιών μπορεί να προσδιοριστεί με ανάλυση εικόνων. Είναι δυνατόν να αποτυπωθεί το περίγραμμα του δοκιμαστικού δοχείου και των φυτών με βιντεοκάμερα (δηλαδή με τοποθέτηση του δοχείου σε φωτοτράπεζα) και να ψηφιοποιηθεί η προκύπτουσα εικόνα. Στη συνέχεια, προσδιορίζεται η συνολική θαλλική επιφάνεια σε ένα δοκιμαστικό δοχείο με βαθμονόμηση με επίπεδα σχήματα γνωστού εμβαδού. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για τον αποκλεισμό των παρεμβολών που οφείλονται στο χείλος του δοχείου. Εναλλακτική, αλλά πιο επίπονη προσέγγιση είναι η λήψη φωτοτυπιών των δοκιμαστικών δοχείων και των φυτών, η αποκοπή του προκύπτοντος περιγράμματος των αποικιών και ο προσδιορισμός της επιφάνειάς τους με αναλυτή φυλλικής επιφάνειας ή χαρτί γραφημάτων. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες τεχνικές (π.χ. αναλογία βάρους χαρτιού μεταξύ της επιφάνειας του περιγράμματος των αποικιών και της μοναδιαίας επιφάνειας).

ii) *Ξηρό βάρος*: Από κάθε δοκιμαστικό δοχείο συλλέγονται όλες οι αποικίες και εκπλύνονται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Στυπώνονται για την απομάκρυνση της περίσσειας νερού και, κατόπιν, ξηραίνονται στους 60 °C μέχρι σταθερού βάρους. Τα ενδεχόμενα θραύσματα ριζών θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται. Το ξηρό βάρος θα πρέπει να εκφράζεται με ακρίβεια τουλάχιστον 0,1 mg.

iii) *Υγρό βάρος*: Όλες οι αποικίες μεταφέρονται σε προζυγισμένους σωλήνες κατασκευασμένους από πολυστυρόλιο (ή άλλο αδρανές υλικό), με στρογγυλό πυθμένα που φέρει μικρές οπές (1 mm). Στη συνέχεια, οι σωλήνες φυγοκεντρούνται στις 3 000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι σωλήνες, που περιέχουν τις στεγνές πλέον αποικίες, επαναζυγίζονται και υπολογίζεται το υγρό βάρος με αφαίρεση του βάρους του κενού σωλήνα.

1.7.10.1. *Συχνότητα των μετρήσεων και αναλυτικών προσδιορισμών*

Εάν εφαρμόζεται σχεδιασμός στατικής δοκιμής, θα πρέπει να μετράται το pH κάθε αγωγής στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Εάν εφαρμόζεται σχεδιασμός ημιστατικής δοκιμής, το pH θα πρέπει να μετράται σε κάθε παρτίδα «πρόσφατου» διαλύματος δοκιμής, πριν από κάθε ανανέωση, καθώς και στα αντίστοιχα «εξαντλημένα» διαλύματα.

▼M1

Η φωτεινή ένταση θα πρέπει να μετράται στον θάλαμο, επωαστήρα ή δωμάτιο ανάπτυξης, σε σημεία που βρίσκονται στην ίδια απόσταση από τη φωτεινή πηγή όπως οι θαλλοί της λέμνας. Οι μετρήσεις θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον μία φορά στη διάρκεια της δοκιμής. Θα πρέπει να καταγράφεται, τουλάχιστον ημερησίως, η θερμοκρασία του θρεπτικού υλικού σε υποκατάστατο δοχείο, το οποίο διατηρείται στις ίδιες συνθήκες στον θάλαμο, επωαστήρα ή δωμάτιο ανάπτυξης.

Στη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας προσδιορίζονται σε κατάλληλα διαστήματα. Η ελάχιστη απαίτηση για τις στατικές δοκιμές είναι ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.

Στις ημιστατικές δοκιμές, κατά τις οποίες η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας αναμένεται να μην παραμείνει εντός των ορίων της ονομαστικής συγκέντρωσης ± 20 %, είναι απαραίτητο να υποβάλλονται σε ανάλυση όλα τα πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής, καθώς και τα ίδια διαλύματα σε κάθε ανανέωση (βλέπε σημείο 1.7.7, τρίτο εδάφιο). Ωστόσο, στην περίπτωση των δοκιμών κατά τις οποίες η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας διαφέρει περισσότερο από ± 20 % από την ονομαστική συγκέντρωση, αλλά μπορούν να προσκομιστούν επαρκή στοιχεία από τα οποία προκύπτει ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις είναι επαναλήψιμες και σταθερές (δηλαδή κυμαίνονται μεταξύ 80 και 120 % της αρχικής συγκέντρωσης), είναι δυνατόν να εκτελείται χημικός προσδιορισμός μόνο για την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής. Σε κάθε περίπτωση, οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας πριν από την ανανέωση είναι αναγκαίο να προσδιορίζονται μόνο σε ένα από τα πολλαπλά δοχεία για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ή στο συνενωμένο περιεχόμενο των δοχείων ανά πολλαπλό προσδιορισμό).

Εάν χρησιμοποιείται συνεχής δοκιμή, ενδείκνυται σύστημα δειγματοληψίας ανάλογο με το περιγραφόμενο για τις ημιστατικές δοκιμές, το οποίο περιλαμβάνει ανάλυση στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της δοκιμής, χωρίς όμως μετρήσεις στα «εξαντλημένα» διαλύματα, που δεν ενδείκνυνται εν προκειμένω. Στον συγκεκριμένο τύπο δοκιμής, θα πρέπει να ελέγχεται ημερησίως η ταχύτητα ροής του μέσου αραίωσης και της ελεγχόμενης ουσίας ή του μητρικού διαλύματος της ελεγχόμενης ουσίας.

Εάν υπάρχουν στοιχεία, από τα οποία προκύπτει ότι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας διατηρήθηκε ικανοποιητικά εντός των ορίων της ονομαστικής ή της μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης ± 20 % σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να βασιστεί στις ονομαστικές ή τις μετρηθείσες αρχικές τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή τη μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση υπερβαίνει το ± 20 %, η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να βασίζεται στον γεωμετρικό μέσο όρο των συγκεντρώσεων κατά την έκθεση ή σε μοντέλα που περιγράφουν τη μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας (11).

1.7.11. **Οριακή δοκιμή**

Σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν από προκαταρτική δοκιμή έχει προκύψει ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε συγκεντρώσεις έως 100 $mg \cdot l^{-1}$ ή έως το όριο διαλυτότητάς της στο υλικό της δοκιμής (αναλόγως του ποια είναι μικρότερη), είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή, η οποία συνίσταται σε σύγκριση των αποκρίσεων μίας ομάδας μάρτυρα και μίας ομάδας αγωγής (συγκέντρωση ίση με 100 $mg \cdot l^{-1}$ ή με το όριο διαλυτότητας). Συνιστάται ένθερμα να τεκμηριώνεται αυτό με ανάλυση της συγκέντρωσης έκθεσης. Η οριακή δοκιμή υπόκειται σε όλες τις συνθήκες δοκιμής και όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που περιγράφονται ανωτέρω, εξαιρουμένου του πλήθους των δοχείων αγωγής, που θα πρέπει να είναι τουλάχιστον διπλάσιο. Η ανάπτυξη στην ομάδα μάρτυρα και στην ομάδα αγωγής είναι δυνατόν να υποβληθεί σε στατιστική ανάλυση με δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων, π.χ. δοκιμή t του Student.

▼M1

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

2.1. ΧΡΟΝΟΣ ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Για τον προσδιορισμό του χρόνου διπλασιασμού (T_d) του αριθμού θαλλών και την τήρηση αυτού του κριτηρίου εγκυρότητας στη μελέτη (σημείο 1.6), εφαρμόζεται ο ακόλουθος τύπος στα δεδομένα που προκύπτουν από τα δοχεία μάρτυρες:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

όπου μ είναι ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, ο οποίος προσδιορίζεται όπως περιγράφεται στο σημείο 2.2.1, πρώτο και δεύτερο εδάφιο.

2.2. ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ

Η δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό των επιδράσεων της ελεγχόμενης ουσίας στη βλαστητική ανάπτυξη της λέμνας. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφονται δύο μεταβλητές απόκρισης, δεδομένου ότι τα κράτη μέλη έχουν διαφορετικές προτιμήσεις και κανονιστικές ανάγκες. Για να είναι τα αποτελέσματα των δοκιμών αποδεκτά σε όλα τα κράτη μέλη, οι επιδράσεις θα πρέπει να αξιολογούνται με χρήση και των δύο μεταβλητών απόκρισης α) και β) που περιγράφονται κατωτέρω.

α) Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης: αυτή η μεταβλητή απόκρισης υπολογίζεται με βάση τις μεταβολές του λογάριθμου του αριθμού θαλλών και, επιπλέον, τις μεταβολές του λογάριθμου μίας δεύτερης μετρούμενης παραμέτρου (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) με την πάροδο του χρόνου (εκφραζόμενες ανά ημέρα) στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα αγωγής. Η εν λόγω μεταβλητή αναφέρεται μερικές φορές ως σχετικός ρυθμός ανάπτυξης (15).

β) Απόδοση: αυτή η μεταβλητή απόκρισης υπολογίζεται με βάση τις μεταβολές του αριθμού θαλλών και, επιπλέον, τις μεταβολές μίας δεύτερης μετρούμενης παραμέτρου (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα αγωγής μέχρι το τέλος της δοκιμής.

Σημειωτέον ότι οι τιμές τοξικότητας που υπολογίζονται με χρήση των ανωτέρω δύο μεταβλητών απόκρισης δεν είναι συγκρίσιμες και η διαφορά αυτή πρέπει να αναγνωρίζεται, όταν χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της δοκιμής. Εφόσον τηρούνται οι συνθήκες δοκιμής που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, οι τιμές EC_x που προκύπτουν από τον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (E_rC_x) είναι γενικά υψηλότερες από τα βασιζόμενα στην απόδοση αποτελέσματα (E_yC_x), λόγω της μαθηματικής βάσης της αντίστοιχης προσέγγισης. Αυτό δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως διαφορά ευαισθησίας μεταξύ των δύο μεταβλητών απόκρισης· πρόκειται απλώς για μαθηματική διαφορά τιμών. Η έννοια του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης βασίζεται στον γενικό λογαριθμικό τύπο ανάπτυξης της λέμνας σε απεριόριστες καλλιέργειες, όπου η τοξικότητα εκτιμάται με βάση τις επιδράσεις στον ρυθμό ανάπτυξης, χωρίς να εξαρτάται από την απόλυτη τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μάρτυρα ούτε από την κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης ούτε από τη διάρκεια της δοκιμής. Αντίθετα, τα αποτελέσματα που βασίζονται στην απόδοση ως μεταβλητή απόκρισης εξαρτώνται από όλες τις προαναφερόμενες άλλες μεταβλητές. Η E_yC_x εξαρτάται από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του είδους λέμνας που χρησιμοποιείται σε κάθε δοκιμή, καθώς και από τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών κλώνων. Η συγκεκριμένη μεταβλητή απόκρισης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη σύγκριση της ευαισθησίας διαφορετικών ειδών ή κλώνων λέμνας σε τοξικούς παράγοντες. Μολονότι είναι προτιμότερο, από επιστημονική άποψη, να χρησιμοποιείται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την εκτίμηση της τοξικότητας, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει και εκτιμήσεις της τοξικότητας με βάση την απόδοση, προκειμένου να καλυφθούν οι κανονιστικές απαιτήσεις που ισχύουν σήμερα σε ορισμένες χώρες.

▼M1

Οι εκτιμήσεις της τοξικότητας θα πρέπει να βασίζονται στον αριθμό θαλλών και σε μία πρόσθετη μετρούμενη παράμετρο (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή ορισμένες ουσίες ενδέχεται να έχουν πολύ μεγαλύτερη επίδραση σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές απ' όση στον αριθμό θαλλών. Η επίδραση αυτή δεν ανιχνεύεται με τον υπολογισμό μόνο του αριθμού θαλλών.

Ο αριθμός θαλλών και κάθε άλλη μετρούμενη μεταβλητή που έχει καταγραφεί, δηλαδή συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος, καταχωρίζονται σε πίνακα μαζί με τις συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας για κάθε χρόνο μέτρησης. Η μετέπειτα ανάλυση δεδομένων, π.χ. για την εκτίμηση της LOEC, NOEC ή EC_x, θα πρέπει να βασίζεται στις τιμές που αντιστοιχούν σε καθένα από τα πολλαπλά δοχεία αγωγής και όχι σε μέσες τιμές που έχουν υπολογιστεί για κάθε ομάδα αγωγής.

2.2.1. **Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης**

Ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για συγκεκριμένη χρονική περίοδο υπολογίζεται ως η λογαριθμική αύξηση των μεταβλητών ανάπτυξης — αριθμός θαλλών και μία ακόμη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) — από τον ακόλουθο τύπο, ο οποίος εφαρμόζεται σε καθένα από τα πολλαπλά δοχεία μάρτυρες και αγωγής:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

όπου:

— μ_{i-j}: μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα i έως j

— N_i: η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή μάρτυρα κατά τη χρονική στιγμή i

— N_j: η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή μάρτυρα κατά τη χρονική στιγμή j

— t: το χρονικό διάστημα i έως j.

Για κάθε ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή του ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης.

Θα πρέπει να υπολογίζεται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για τη συνολική διάρκεια της δοκιμής (η χρονική στιγμή «i» στον ανωτέρω τύπο είναι η αρχή της δοκιμής και η χρονική στιγμή «j» το τέλος της). Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και κάθε μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης. Επιπλέον, θα πρέπει να υπολογίζεται ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης με σκοπό την αξιολόγηση των επιδράσεων της ελεγχόμενης ουσίας στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης (π.χ. με εξέταση των λογαριθμικά μετασχηματισμένων καμπυλών ανάπτυξης). Ουσιαστικές διαφορές μεταξύ του τμηματικού και του μέσου ρυθμού ανάπτυξης υποδηλώνουν απόκλιση από τη σταθερή εκθετική ανάπτυξη και δικαιολογούν την ενδελεχή εξέταση των καμπυλών ανάπτυξης. Μια συντηρητική προσέγγιση στην περίπτωση αυτή είναι η σύγκριση των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα μέγιστης αναστολής μεταξύ των καλλιεργειών που έχουν υποβληθεί σε αγωγή και των μαρτύρων.

▼M1

Στη συνέχεια, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης (I_r) για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ομάδα αγωγής) από τον ακόλουθο τύπο:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

όπου:

— % I_r: εκατοστιαία αναστολή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης

— μ_C: μέση τιμή του μ στον μάρτυρα

— μ_T: μέση τιμή του μ στην ομάδα αγωγής

2.2.2. **Απόδοση**

Οι επιδράσεις στην απόδοση προσδιορίζονται με βάση τις δύο μετρούμενες μεταβλητές — αριθμός θαλλών και μία ακόμη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) — των οποίων η παρουσία διαπιστώνεται σε κάθε δοκιμαστικό δοχείο στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Στην περίπτωση του ξηρού ή υγρού βάρους, η αρχική βιομάζα προσδιορίζεται σε δείγμα θαλλών λαμβανόμενο από την παρτίδα που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των δοκιμαστικών δοχείων (βλέπε σημείο 1.7.3, δεύτερο εδάφιο). Για κάθε ελεγχόμενη συγκέντρωση και κάθε μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή της απόδοσης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης. Η εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης (%I_y) μπορεί να υπολογιστεί για κάθε ομάδα αγωγής με τον ακόλουθο τύπο:

$$\% I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

όπου:

— % I_y: εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης

— b_C: τελική βιομάζα μείον αρχική βιομάζα στην ομάδα μάρτυρα

— b_T: τελική βιομάζα μείον αρχική βιομάζα στην ομάδα αγωγής

2.2.3. **Χάραξη των καμπυλών συγκέντρωσης-απόκρισης**

Θα πρέπει να χαράσσονται καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης, που συνδέουν τη μέση τιμή της εκατοστιαίας αναστολής της μεταβλητής απόκρισης (I_r ή I_y, υπολογιζόμενη όπως υποδεικνύεται στο τελευταίο εδάφιο του σημείου 2.2.1 ή 2.2.2, αντίστοιχα) με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας.

2.2.4. **Εκτίμηση της EC_x**

Οι εκτιμήσεις της EC_x (π.χ. EC_{50}) θα πρέπει να βασίζονται τόσο στον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (E_rC_x), όσο και στην απόδοση (E_yC_x). Καθεμία από τις μεταβλητές αυτές θα πρέπει να βασίζεται στον αριθμό θαλλών και σε μία πρόσθετη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή υπάρχουν ελεγχόμενες ουσίες με διαφορετική επίδραση στον αριθμό θαλλών απ' ότι σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές. Επομένως, οι επιθυμητές παράμετροι τοξικότητας είναι τέσσερις τιμές EC_x για κάθε βαθμό αναστολής x που έχει υπολογιστεί: E_rC_x (αριθμός θαλλών), E_rC_x (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), E_yC_x (αριθμός θαλλών) και E_yC_x (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος).

▼M1

2.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

Το ζητούμενο είναι να ληφθεί ποσοτική σχέση συγκέντρωσης-επίδοσης με ανάλυση παλινδρόμησης. Είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, μετά από γραμμικό μετασχηματισμό των δεδομένων απόκρισης, λόγου χάριν, σε μονάδες probit ή logit ή Weibull (16), αλλά προτιμώνται οι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης, με τις οποίες αντιμετωπίζονται καλύτερα οι αναπόφευκτες ανωμαλίες των δεδομένων και οι αποκλίσεις τους από τις ομαλές κατανομές. Στις περιοχές είτε της μηδενικής είτε της πλήρους αναστολής, οι ανωμαλίες αυτές ενδέχεται να μεγεθυνθούν από τον μετασχηματισμό και να παρεμποδίσουν την ανάλυση (16). Σημειωτέον ότι οι συνήθεις μέθοδοι ανάλυσης με χρήση αποτελεσμάτων μετασχηματισμού probit, logit ή Weibull προορίζονται για δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (π.χ. θνησιμότητα ή επιβίωση) και πρέπει να τροποποιούνται για να καλύψουν δεδομένα ανάπτυξης ή βιομάζας. Ειδικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό τιμών EC_x από συνεχή δεδομένα παρατίθενται στις δημοσιεύσεις (17) (18) και (19).

Για κάθε μεταβλητή απόκρισης που πρόκειται να αναλυθεί, χρησιμοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης για την εκτίμηση των σημείων των τιμών EC_x. Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει να προσδιορίζονται, για κάθε εκτίμηση, τα όρια εμπιστοσύνης 95 %. Η καλή προσαρμογή των δεδομένων απόκρισης στο μοντέλο παλινδρόμησης θα πρέπει να αξιολογείται με γραφική ή στατιστική μέθοδο. Η ανάλυση παλινδρόμησης θα πρέπει να εκτελείται με χρήση των αποκρίσεων στα επιμέρους δοχεία και όχι των μέσων όρων των ομάδων αγωγής.

Εάν τα διαθέσιμα μοντέλα/μέθοδοι παλινδρόμησης είναι ακατάλληλα για τα δεδομένα, μπορούν επίσης να ληφθούν εκτιμήσεις και όρια εμπιστοσύνης για την EC_{50} με γραμμική παρεμβολή με τεχνική εύρεσης εκτιμητριών bootstrap (20).

Για την εκτίμηση της LOEC και, κατ' επέκταση, της NOEC, είναι αναγκαία η σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων αγωγής με τεχνικές ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA). Στη συνέχεια, ο μέσος όρος για κάθε συγκέντρωση πρέπει να συγκρίνεται με τον μέσο όρο του μάρτυρα με κατάλληλη μέθοδο πολλαπλής σύγκρισης ή δοκιμής τάσης. Χρήσιμη για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η δοκιμή του Dunnett ή του Williams (21) (22) (23) (24). Είναι απαραίτητο να κρίνεται αν ευσταθεί η παραδοχή της ANOVA για ομοιογενή διακύμανση. Η αξιολόγηση αυτή μπορεί να διενεργηθεί γραφικά ή με επίσημη δοκιμή (25). Κατάλληλες σχετικές δοκιμές είναι εκείνες του Levene και του Bartlett. Εάν δεν ισχύει η παραδοχή της ομοιογένειας της διακύμανσης, αυτό είναι μερικές φορές δυνατόν να διορθωθεί με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Στις περιπτώσεις ακραίας ετερογένειας της διακύμανσης, η οποία δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί με μετασχηματισμό, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης με μεθόδους όπως οι μειωτικές δοκιμές τάσης Jonkheere. Πρόσθετη καθοδήγηση σχετικά με τον προσδιορισμό της NOEC παρέχεται στη δημοσίευση (19).

Οι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις υπαγόρευσαν τη σύσταση να εγκαταλειφθεί η έννοια της NOEC και να αντικατασταθεί από εκτιμήσεις των σημείων των τιμών EC_x βάσει παλινδρόμησης. Δεν έχει καθοριστεί κατάλληλη τιμή του x για την παρούσα δοκιμή σε λέμνα. Φαίνεται, ωστόσο, να ενδείκνυται ένα εύρος 10 έως 20 % (ανάλογα με την επιλεγμένη μεταβλητή απόκρισης), κατά προτίμηση μάλιστα, θα πρέπει να αναφέρονται τόσο η EC_{10}, όσο και η EC_{20}.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ**

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική υπόσταση και φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του ορίου υδατοδιαλυτότητας,

▼M1

— δεδομένα χημικής ταυτοποίησης (π.χ. αριθ. CAS), συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας.

Είδος οργανισμού δοκιμής:

— επιστημονική ονομασία, κλώνος (εάν είναι γνωστός) και πηγή.

Συνθήκες δοκιμής:

— εφαρμοζόμενη διαδικασία δοκιμής (στατική, ημιστατική ή συνεχής),

— ημερομηνία έναρξης και διάρκεια της δοκιμής,

— υλικό δοκιμής,

— περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού: δοκιμαστικά δοχεία και καλύμματα, όγκοι διαλυμάτων, αριθμός αποικιών και θαλλών ανά δοκιμαστικό δοχείο στην αρχή της δοκιμής,

— συγκεντρώσεις δοκιμής (ονομαστικές και μετρηθείσες, κατά περίπτωση) και πλήθος δοχείων (replicates) ανά συγκέντρωση,

— μέθοδοι παρασκευής των μητρικών διαλυμάτων και των διαλυμάτων δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης της ενδεχόμενης χρήσης διαλυτών ή μέσων διασποράς,

— θερμοκρασία κατά τη δοκιμή,

— πηγή, ένταση και ομοιογένεια του φωτός,

— τιμές pH των υλικών δοκιμής και μάρτυρα,

— συγκεντρώσεις και μέθοδος ανάλυσης της ελεγχόμενης ουσίας, με τα κατάλληλα δεδομένα αξιολόγησης της ποιότητας (μελέτες επικύρωσης, τυπικές αποκλίσεις ή όρια εμπιστοσύνης των αναλύσεων),

— μέθοδοι προσδιορισμού του αριθμού θαλλών και των τιμών άλλων μετρούμενων μεταβλητών, π.χ. ξηρό βάρος, υγρό βάρος ή θαλλική επιφάνεια,

— όλες οι παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Αποτελέσματα:

— ανεπεξέργαστα δεδομένα: αριθμός θαλλών και τιμές άλλων μετρούμενων μεταβλητών για κάθε δοκιμαστικό δοχείο και μάρτυρα σε κάθε παρατήρηση και χρόνο ανάλυσης,

— μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις για κάθε μετρούμενη μεταβλητή,

— καμπύλες ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση (συνιστάται να χαράσσονται με λογαριθμικό μετασχηματισμό των μετρούμενων μεταβλητών, βλέπε σημείο 2.2.1, δεύτερο εδάφιο),

— χρόνος διπλασιασμού/ρυθμός ανάπτυξης στον μάρτυρα, με βάση τον αριθμό θαλλών,

— υπολογισθείσες μεταβλητές απόκρισης για καθένα από τα πολλαπλά δοχεία αγωγής, συνοδευόμενες από τους μέσους όρους και τον συντελεστή μεταβολής για τους πολλαπλούς προσδιορισμούς,

— γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-επίδρασης,

— εκτιμήσεις των τελικών σημείων τοξικότητας για τις μεταβλητές απόκρισης, π.χ. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές LOEC and NOEC, εφόσον έχουν υπολογιστεί, και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό αυτό,

▼M1

— εάν έχει χρησιμοποιηθεί τεχνική ANOVA, το ανιχνεύσιμο μέγεθος της επίδρασης (π.χ. η ελάχιστη σημαντική διαφορά),

— διέγερση της ανάπτυξης που ενδεχομένως διαπιστώθηκε σε ομάδα αγωγής,

— τυχόν ορατά σημεία φυτοτοξικότητας, καθώς και παρατηρήσεις των διαλυμάτων δοκιμής,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, όπου συμπεριλαμβάνεται η ενδεχόμενη επίδραση παρεκκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στα αποτελέσματα της δοκιμής.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD TG 221 (2006) Lemna Sp. Growth Inhibition Test

(2) Η χρήση μελετών σε Lemna για έγχρωμες ουσίες περιγράφεται λεπτομερώς στο τμήμα 13.5.3 του Εγχειριδίου Αποφάσεων της ΕΕ του Ιουλίου του 2006, στην ιστοσελίδα http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, διαθέσιμο στην ιστοσελίδα

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

(4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(5) USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.

(6) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

(7) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (στη σουηδική γλώσσα).

(8) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37-120 pp

(9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

(11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.

(12) ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

▼M1

(13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor L.*). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353-359.

(15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481-483.

(16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

(17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

(18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494.

(19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

(21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(23) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

▼M1

Προσάρτημα 1

Περιγραφή του φυτού *Lemna* SPP.

Το υδρόβιο φυτό *Lemna* spp., κοινώς λέμνα ή φακή του νερού, ανήκει στην οικογένεια λεμνίδες (*Lemnaceae*), που περιλαμβάνει ορισμένα κοσμοπολίτικα είδη, ταξινομημένα σε τέσσερα γένη. Οι διαφορές τους ως προς την εμφάνιση και τη συστηματική κατάταξη έχουν περιγραφεί εκτενώς (1)(2). Τα είδη *Lemna gibba* και *L. minor* είναι αντιπροσωπευτικά των εύκρατων περιοχών και χρησιμοποιούνται ευρέως σε δοκιμές τοξικότητας. Και τα δύο αυτά είδη έχουν έναν επιπλέοντα ή βυθισμένο δισκοειδή βλαστό (θαλλό), ενώ από το κέντρο της κάτω επιφάνειας κάθε θαλλού εξέρχεται μία λεπτότατη ρίζα. Η λέμνα σπάνια παράγει άνθη και τα φυτά πολλαπλασιάζονται με βλαστητική αναπαραγωγή, παράγοντας νέους θαλλούς (3). Σε σύγκριση με τα φυτά μεγαλύτερης ηλικίας, τα νεαρότερα έχουν ασθενέστερο χρώμα και βραχύτερες ρίζες και αποτελούνται από δύο έως τρεις θαλλούς διαφορετικών μεγεθών. Το μικρό μέγεθος της λέμνας, η απλή δομή της, η αγενής αναπαραγωγή της και ο μικρός χρόνος γενεάς καθιστούν τα φυτά του γένους αυτού ιδιαίτερα κατάλληλα για εργαστηριακές δοκιμές (4) (5).

Λόγω πιθανών διειδικών διαφορών στην ευαισθησία, μόνο οι συγκρίσεις ευαισθησίας εντός του ίδιου είδους είναι έγκυρες.

Παραδείγματα ειδών λέμνας που έχουν χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές: αναφορά των ειδών στη βιβλιογραφία

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp (στη σουηδική γλώσσα).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

▼M1

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Πηγές ειδών λέμνας

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
M5S 3 B2 Toronto, Ontario Καναδάς
Τηλ.: +1-416-978-3641
Φαξ: +1-416-978-5878
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: jacreman@botany.utoronto.ca
Διαδίκτυο: http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
ΗΠΑ
Τηλ.: +1 (919) 515-7572
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 Stockholm
Σουηδία
Τηλ.: +46 8 674 7240
Φαξ: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Γερμανία
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: lemna@uba.de
Διαδίκτυο: http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Βιβλιογραφία

(1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼**M1**

Προσάρτημα 2

Διατήρηση της μητρικής καλλιέργειας

Οι μητρικές καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε χαμηλότερη θερμοκρασία (4-10 °C) για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, χωρίς να χρειάζεται να παρασκευαστούν εκ νέου. Για τις μητρικές καλλιέργειες μπορεί να χρησιμοποιείται το ίδιο θρεπτικό υλικό με εκείνο της δοκιμής, αλλά και άλλα, πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία υλικά.

Κατά διαστήματα, μερικά νεαρά φυτά χρώματος ανοικτού πράσινου μεταφέρονται με τεχνική ασηψίας σε νέα δοχεία καλλιέργειας, τα οποία περιέχουν πρόσφατα παρασκευασμένο υλικό. Στις συνθήκες χαμηλότερης θερμοκρασίας που υποδεικνύονται στη παρούσα μέθοδο, η ανακαλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιείται ανά τρίμηνο κατ' ανώτατο όριο.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικώς καθαρά (έκπλυση με οξέα) και στείρα γυάλινα δοχεία καλλιέργειας και να εφαρμόζονται τεχνικές εργασίας σε συνθήκες ασηψίας. Εάν μολυνθεί η μητρική καλλιέργεια, π.χ. από φύκη ή μύκητες, απαιτούνται μέτρα για την εξάλειψη των ξένων οργανισμών. Στην περίπτωση των φυκών και των περισσότερων άλλων ξένων οργανισμών, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με επιφανειακή αποστείρωση. Λαμβάνεται δείγμα του μολυσμένου φυτικού υλικού και κόβονται οι ρίζες. Στη συνέχεια, το υλικό αυτό αναταράσσεται ζωηρά μέσα σε καθαρό νερό και εμβαπτίζεται σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5 % (v/v) για χρονικό διάστημα μεταξύ 30 δευτερολέπτων και 5 λεπτών. Το φυτικό υλικό εκπλύνεται, κατόπιν, με στείρο νερό και κατανέμεται σε έναν ορισμένο αριθμό δοχείων καλλιέργειας που περιέχουν πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό υλικό (παρτίδες). Η κατεργασία αυτή έχει ως επακόλουθο τον θάνατο πολλών θαλλών, ιδίως όταν η έκθεση διαρκεί περισσότερο χρόνο, αλλά ορισμένοι από τους επιζώντες είναι συνήθως απαλλαγμένοι από μόλυνση. Οι τελευταίοι μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν για τον εμβολιασμό νέων καλλιεργειών.

▼M1

Προσάρτημα 3

Θρεπτικά υλικά

Συνιστώνται διαφορετικά θρεπτικά υλικά για τα είδη *L. minor* και *L. gibba*. Για το *L. minor*, συνιστάται το υλικό του Σουηδικού Ινστιτούτου Τυποποίησης (SIS), τροποποιημένο, ενώ για το *L. gibba*, το υλικό 20X AAP. Η σύσταση των δύο υλικών παρατίθεται κατωτέρω. Κατά τη παρασκευή των εν λόγω υλικών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστηρίου ή αναλυτικής και απιονισμένο νερό.

Σουηδικό πρότυπο θρεπτικό υλικό για λέμνα (SIS)

— Τα μητρικά διαλύματα I-V αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο (120 °C, 15 λεπτά) ή με διήθηση μέσω μεμβράνης (διάμετρος πόρων 0,2 μm περίπου).

— Τα μητρικά διαλύματα VI και VII (προαιρετικό) αποστειρώνονται μόνο με διήθηση μέσω μεμβράνης και δεν πρέπει να θερμαίνονται σε αυτόκαυστο.

— Τα στείρα μητρικά διαλύματα θα πρέπει να φυλάσσονται σε συνθήκες ψύχους και σκότους. Τα διαλύματα I-V θα πρέπει να απορρίπτονται μετά από έξι μήνες, ενώ η διάρκεια αποθήκευσης των διαλυμάτων VI και VII (προαιρετικό) είναι ένας μήνας.

Αριθ. μητρικού διαλύματος	Ουσία	Συγκέντρωση στο μητρικό διάλυμα ($g \cdot l^{-1}$)	Συγκέντρωση στο παρασκευαζόμενο υλικό ($mg \cdot l^{-1}$)	Παρασκευαζόμενο υλικό	
				Στοιχείο	Συγκέντρωση ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na · N	32 · 14
	KH_2PO4	1,34	13,4	K · P	6,0 · 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg · S	7,4 · 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca · Cl	9,8 · 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA·$2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (ρυθμιστικό διάλυμα)	490	490	—	—

— Για την παρασκευή 1 λίτρου υλικού SIS, προστίθενται σε 900 ml απιονισμένου νερού τα ακόλουθα:

— 10 ml μητρικού διαλύματος I

— 5 ml μητρικού διαλύματος II

— 5 ml μητρικού διαλύματος III

— 5 ml μητρικού διαλύματος IV

▼M1

— 1 ml μητρικού διαλύματος V

— 5 ml μητρικού διαλύματος VI

— 1 ml μητρικού διαλύματος VII (προαιρετικά).

Σημ.: Για ορισμένες ελεγχόμενες ουσίες, ενδέχεται να χρειάζεται ένα επιπλέον μητρικό διάλυμα, VII [ρυθμιστικό διάλυμα MOPS (μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ) — βλέπε σημείο 1.4, τελευταίο εδάφιο].

— Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6,5 ± 0,2 με 0,1 ή 1 mol HCl ή NaOH και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο με απιονισμένο νερό.

Θρεπτικό υλικό 20X AAP

Τα μητρικά διαλύματα παρασκευάζονται με στείρο απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

Τα στείρα μητρικά διαλύματα θα πρέπει να φυλάσσονται σε συνθήκες ψύχους και σκότους. Στις συνθήκες αυτές, η διάρκεια αποθήκευσης των διαλυμάτων είναι τουλάχιστον 6-8 εβδομάδες.

Για το υλικό 20X — AAP, παρασκευάζονται πέντε μητρικά διαλύματα θρεπτικών στοιχείων (A1, A2, A3, B και Γ), με χρήση χημικών ουσιών καθαρότητας αντιδραστηρίου. Λαμβάνονται 20 ml από κάθε μητρικό διάλυμα θρεπτικών στοιχείων και προστίθενται σε περίπου 850 ml απιονισμένου νερού για να προκύψει το θρεπτικό υλικό. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 7,5 ± 0,1 με 0,1 ή 1 mol HCl ή NaOH και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο με απιονισμένο νερό. Το υλικό διηθείται κατόπιν σε στείρο υποδοχέα μέσω διηθητικής μεμβράνης των 0,2 μm (περίπου).

Το θρεπτικό υλικό που προορίζεται για τη διεξαγωγή της δοκιμής θα πρέπει να έχει παρασκευαστεί 1-2 ημέρες πριν χρησιμοποιηθεί, ώστε να είναι δυνατόν να σταθεροποιηθεί το pH. Το pH του θρεπτικού υλικού θα πρέπει να ελέγχεται πριν από τη χρήση του και, εάν είναι απαραίτητο, να ρυθμίζεται εκ νέου με την προσθήκη διαλύματος NaOH ή HCl 0,1 ή 1 M, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Αριθμός μητρικού διαλύματος	Ουσία	Συγκέντρωση στο μητρικό διάλυμα ($g \cdot l^{-1}$) (*)	Συγκέντρωση στο παρασκευαζόμενο υλικό ($mg \cdot l^{-1}$) (*)	Παρασκευαζόμενο υλικό	
				Στοιχείο	Συγκέντρωση ($mg \cdot l^{-1}$) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na · N	190 · 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K · P	9,4 · 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
Γ	$NaHCO_3$	15	300	Na · C	220 · 43

(*) Εκτός αντίθετης μνείας.

▼M1

Σημείωση: Η θεωρητικά ενδεδειγμένη τελική συγκέντρωση όξινων ανθρακικών ιόντων (η οποία αποτρέπει την αισθητή ρύθμιση του pH) είναι 15 mg/l και όχι 300 mg/l. Ωστόσο, η χρήση του υλικού 20X-AAP στο παρελθόν, συμπεριλαμβανομένης της κυκλικής δοκιμής της παρούσας μεθόδου, έχει βασιστεί σε 300 mg/l (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency).

Θρεπτικό υλικό Steinberg (κατά το πρότυπο ISO 20079)

Συγκεντρώσεις και μητρικά διαλύματα

— Κατά το πρότυπο ISO 20079, το τροποποιημένο υλικό Steinberg χρησιμοποιείται μόνο για το είδος *Lemna minor* (δεδομένου ότι το πρότυπο αυτό επιτρέπει μόνο το *Lemna minor*), αλλά έχει αποδειχθεί με δοκιμές ότι είναι δυνατόν να επιτευχθούν ικανοποιητικά αποτελέσματα με τη χρήση του και για το είδος *Lemna gibba*.

— Κατά την παρασκευή του εν λόγω υλικού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστηρίου ή αναλυτικής και απιονισμένο νερό.

— Παρασκευάζεται το θρεπτικό υλικό από μητρικά διαλύματα ή από το πυκνό υλικό δεκαπλάσιας συγκέντρωσης, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα επίτευξης μέγιστης συγκέντρωσης χωρίς καθίζηση.

Πίνακας 1

Υλικό Steinberg σταθερού pH (τροποποιημένο κατά Altenburger)

Ουσία		Θρεπτικό υλικό	
Μακροθρεπτικά στοιχεία	Μοριακό βάρος	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Μικροθρεπτικά στοιχεία	Μοριακό βάρος	μg/l	μmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA, διένυδρο άλας με νάτριο	372,24	1 500,00	4,03

▼**M1**

Πίνακας 2

Μητρικά διαλύματα (μακροθρεπτικά στοιχεία)

1. **Μακροθρεπτικά στοιχεία (σε 50πλάσια συγκέντρωση)**	g/l
Μητρικό διάλυμα 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Μητρικό διάλυμα 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Μητρικό διάλυμα 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Πίνακας 3

Μητρικά διαλύματα (μικροθρεπτικά στοιχεία)

2. **Μικροθρεπτικά στοιχεία (σε εκατονταπλάσια συγκέντρωση)**	mg/l
Μητρικό διάλυμα 4:	
H_3BO_3	120,0
Μητρικό διάλυμα 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Μητρικό διάλυμα 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Μητρικό διάλυμα 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Μητρικό διάλυμα 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA, διένυδρο άλας με νάτριο	1 500,00

— Τα μητρικά διαλύματα αριθ. 2 και 3, όπως επίσης τα διαλύματα αριθ. 4 έως 7 είναι δυνατόν να ενωθούν (λαμβανομένων υπόψη των απαιτούμενων συγκεντρώσεων).

— Για να παραταθεί η διάρκεια αποθήκευσης, τα μητρικά διαλύματα θερμαίνονται σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά ή, εναλλακτικά, υποβάλλονται σε αποστειρωτική διήθηση (ηθμός των 0,2 μm). Στην περίπτωση του μητρικού διαλύματος αριθ. 8, συνιστάται ένθερμα η αποστειρωτική διήθηση (ηθμός των 0,2 μm).

Παρασκευή του (τροποποιημένου) υλικού Steinberg με την τελική συγκέντρωση

— Σε 900 ml απιονισμένου νερού περίπου, προστίθενται 20 ml από τα μητρικά διαλύματα αριθ. 1, 2 και 3 (βλέπε πίνακα 2), κατά τρόπο ώστε να αποφευχθεί η καθίζηση.

— Προστίθεται 1,0 ml από τα μητρικά διαλύματα αριθ. 4, 5, 6, 7 και 8 (βλέπε πίνακα 3).

— Το pH θα πρέπει να είναι 5,5 ± 0,2 (ρυθμίζεται με την προσθήκη του ελάχιστου δυνατού όγκου διαλύματος NaOH ή HCl).

▼**M1**

— Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με νερό.

— Εάν τα μητρικά διαλύματα είναι αποστειρωμένα και χρησιμοποιείται το ενδεδειγμένο νερό, δεν απαιτείται περαιτέρω αποστείρωση. Εάν αποστειρώνεται το τελικό υλικό, το μητρικό διάλυμα αριθ. 8 θα πρέπει να προστίθεται μετά τη θέρμανση σε αυτόκαυστο (στους 121 °C για 20 λεπτά).

Παρασκευή του πυκνού (τροποποιημένου) υλικού Steinberg με δεκαπλάσια συγκέντρωση για ενδιάμεση αποθήκευση

— Σε 30 ml απιονισμένου νερού περίπου, προστίθενται 20 ml από τα μητρικά διαλύματα αριθ. 1, 2 και 3 (βλέπε πίνακα 2), κατά τρόπο ώστε να αποφευχθεί η καθίζηση.

— Προστίθεται 1,0 ml από τα μητρικά διαλύματα αριθ. 4, 5, 6, 7 και 8 (βλέπε πίνακα 3). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 100 ml με νερό.

— Εάν τα μητρικά διαλύματα είναι αποστειρωμένα και χρησιμοποιείται το ενδεδειγμένο νερό, δεν απαιτείται περαιτέρω αποστείρωση. Εάν αποστειρώνεται το τελικό υλικό, το μητρικό διάλυμα αριθ. 8 θα πρέπει να προστίθεται μετά τη θέρμανση σε αυτόκαυστο (στους 121 °C για 20 λεπτά).

— Το pH του υλικού (τελική συγκέντρωση) θα πρέπει να είναι 5,5 ± 0,2.

▼M4

Γ.27 ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΧΕΙΡΟΝΟΜΙΔΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ- ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 218 του ΟΟΣΑ (2004). Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η εκτίμηση των επιδράσεων της παρατεταμένης έκθεσης χημικών ουσιών στις προνύμφες των ειδών δίπτερων Chironomus sp. των γλυκών υδάτων, οι οποίες διαβιούν σε ιζήματα. Βασίζεται στα υπάρχοντα πρωτόκολλα δοκιμών τοξικότητας για τα είδη *Chironomus riparius* και *Chironomus tentans*, που έχουν καταρτιστεί στην Ευρώπη (1)(2)(3) και στη Βόρεια Αμερική (4)(5)(6)(7)(8) και έχουν υποβληθεί σε κυκλική δοκιμή επικύρωσης (1)(6)(9). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη χειρονομίδων για τα οποία υπάρχει επαρκής τεκμηρίωση, π.χ. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Το σενάριο έκθεσης που εφαρμόζεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι ο εμβολιασμός του ιζήματος με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Η επιλογή του κατάλληλου σεναρίου έκθεσης εξαρτάται από την επιδιωκόμενη εφαρμογή της δοκιμής. Το σενάριο του εμβολιασμού ιζήματος αποσκοπεί στην προσομοίωση συσσωρευμένων επιπέδων χημικών ουσιών που παραμένουν στο ίζημα. Αυτό το σύστημα έκθεσης περιλαμβάνει τον εμβολιασμό του ιζήματος ενός δοκιμαστικού συστήματος ιζήματος-νερού.

3. Οι ουσίες που πρέπει να ελέγχονται έναντι οργανισμών που διαβιούν σε ιζήματα συνήθως παραμένουν σε αυτό το διαμέρισμα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Οι οργανισμοί που διαβιούν σε ιζήματα ενδέχεται να εκτίθενται μέσω διαφόρων οδών. Η σχετική σημασία κάθε οδού έκθεσης, καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για να συμβάλει η καθεμία στις συνολικές τοξικές επιδράσεις, εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της εκάστοτε χημικής ουσίας. Για ουσίες με ισχυρή προσρόφηση (π.χ. με $\log K_{ow} > 5$) ή για ουσίες που συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς με ιζήματα, η πρόσληψη μολυσμένων τροφών μπορεί να αποτελεί σημαντική οδό έκθεσης. Προκειμένου να μην υποτιμάται η τοξικότητα των εξαιρετικά λιπόφιλων ουσιών, μπορεί να εξετάζεται η χρήση τροφής που έχει προστεθεί στο ίζημα πριν από την εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Για να λαμβάνονται υπόψη όλες οι δυνητικές οδοί έκθεσης, η παρούσα μέθοδος δοκιμών εστιάζει στη μακροχρόνια έκθεση. Η διάρκεια της δοκιμής κυμαίνεται μεταξύ 20 και 28 ημερών για τα είδη *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, και από 28 έως 65 ημέρες για το *C. tentans*. Εάν απαιτούνται βραχυπρόθεσμα δεδομένα για συγκεκριμένο σκοπό, π.χ. για τη διευρεύνηση των επιδράσεων μιας ασταθούς χημικής ουσίας, τα πρόσθετα δείγματα πολλαπλού προσδιορισμού (replicates) μπορούν να αποσύρονται μετά από μια περίοδο δέκα ημερών.

4. Τα μετρούμενα καταληκτικά σημεία είναι ο συνολικός αριθμός εμφανιζόμενων ενηλίκων ατόμων και ο χρόνος μέχρι την εμφάνιση. Εάν απαιτούνται επιπλέον βραχυπρόθεσμα δεδομένα, συνιστάται να μετράται η επιβίωση και η ανάπτυξη των προνυμφών μόνο μετά από ένα δεκαήμερο, με τη χρήση των κατάλληλων πρόσθετων δειγμάτων πολλαπλού προσδιορισμού.

5. Συνιστάται η χρήση μορφοποιημένου ιζήματος, το οποίο παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα φυσικά ιζήματα:

   — η πειραματική μεταβλητότητα μειώνεται, επειδή το εν λόγω ίζημα σχηματίζει μια αναπαραγόμενη «τυποποιημένη μήτρα» και εκλείπει η ανάγκη εξεύρεσης πηγών αμόλυντου και καθαρού ιζήματος,

   — οι δοκιμές μπορούν να αρχίζουν ανά πάσα στιγμή χωρίς να αντιμετωπίζουν τις εποχιακές διακυμάνσεις του ιζήματος δοκιμής και δεν απαιτείται προκατεργασία του ιζήματος για την απομάκρυνση της αυτόχθονης πανίδας. Με τη χρήση μορφοποιημένων ιζημάτων μειώνεται επίσης το κόστος που συνεπάγεται η επιτόπια συλλογή επαρκών ποσοτήτων ιζημάτων για δοκιμές ρουτίνας,

   — η χρήση μορφοποιημένων ιζημάτων παρέχει τη δυνατότητα συγκρίσεων της τοξικότητας και κατάταξης των ουσιών αναλόγως.

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

▼M4

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Προνύμφες χειρονομίδων πρώτου σταδίου εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε συστήματα ιζήματος-νερού. Η ελεγχόμενη χημική ουσία εμβολιάζεται στο ίζημα και, στη συνέχεια, οι προνύμφες πρώτου σταδίου εισάγονται σε ποτήρια ζέσεως στα οποία έχουν σταθεροποιηθεί οι συγκεντρώσεις του ιζήματος και του νερού. Στο τέλος της δοκιμής μετρώνται η εμφάνιση χειρονομίδων και ο ρυθμός ανάπτυξής τους. Η επιβίωση και το βάρος των προνυμφών μπορούν επίσης να μετρηθούν μετά από 10 ημέρες, εάν απαιτείται (με τη χρήση των κατάλληλων πρόσθετων δειγμάτων πολλαπλού προσδιορισμού). Αυτά τα δεδομένα αναλύονται με τη χρήση είτε μοντέλου παλινδρόμησης, ώστε να εκτιμάται η συγκέντρωση που μπορεί να προκαλέσει × % μείωση της εμφάνισης προνυμφών ή της επιβίωσης ή ανάπτυξής τους (π.χ. EC_{15}, EC_{50} κ.λπ.), είτε δοκιμασίας στατιστικής υπόθεσης για τον προσδιορισμό NOEC (συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις)/LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενων επιδράσεων). Στη δεύτερη περίπτωση, απαιτείται σύγκριση μεταξύ των τιμών επίδρασης και των τιμών-μαρτύρων με στατιστικές δοκιμασίες.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

8. Θα πρέπει να είναι γνωστές η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της ελεγχόμενης ουσίας, η μετρούμενη ή υπολογιζόμενη κατανομή της στο ίζημα και η σταθερότητά της στο νερό και το ίζημα. Θα πρέπει να διατίθεται αξιόπιστη μέθοδος ανάλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας στο υπερκείμενο νερό, στο ενδοπορικό νερό και στα ιζήματα, με γνωστή και δημοσιευμένη ορθότητα (accuracy) και όριο ανίχνευσης. Στις χρήσιμες πληροφορίες συγκαταλέγονται ο συντακτικός τύπος και η καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας. Χρήσιμο στοιχείο είναι επίσης η χημική πορεία της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. διασπορά, βιοτική και αβιοτική αποικοδόμηση κ.λπ.). Περαιτέρω καθοδήγηση για τις δοκιμές ουσιών με φυσικοχημικές ιδιότητες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής παρέχεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (12).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Μπορούν να ελέγχονται κατά περιόδους χημικές ουσίες αναφοράς για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας του πρωτοκόλλου και των συνθηκών της δοκιμής. Μερικές από τις τοξικές ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιούνται με επιτυχία σε κυκλικές δοκιμές και μελέτες επικύρωσης είναι το λινδάνιο, η τριφλουραλίνη, η πενταχλωροφαινόλη, το χλωριούχο κάδμιο και το χλωριούχο κάλιο (1)(2)(5)(6)(13).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Για να θεωρηθεί έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

— το ποσοστό εμφάνισης στους μάρτυρες πρέπει να ανέρχεται σε τουλάχιστον 70 % στο τέλος της δοκιμής (1)(6),

— η εμφάνιση ενηλίκων *C. riparius* και *C. yoshimatsui* στα δοχεία-μάρτυρες θα πρέπει να παρατηρείται μεταξύ 12ης και 23ης ημέρας από την εισαγωγή τους στα δοχεία, ενώ για το *C. tentans* απαιτείται περίοδος 20 έως 65 ημερών,

— στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να μετρώνται το pH και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε κάθε δοχείο. Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 60 % της τιμής κορεσμού του αέρα (ASV) στη χρησιμοποιούμενη θερμοκρασία και το pH του υπερκείμενου νερού να είναι της τάξης του 6-9 σε όλα τα δοχεία δοκιμής,

— η θερμοκρασία του νερού δεν πρέπει να διαφέρει κατά περισσότερο από ± 1,0 °C. Μπορεί να ελέγχεται με τη χρήση ισοθερμικής αίθουσας και, στην περίπτωση αυτή, η θερμοκρασία δωματίου πρέπει να επιβεβαιώνεται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα.

▼M4

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Δοχεία δοκιμής

11. Η μελέτη διεξάγεται σε γυάλινα ποτήρια ζέσεως των 600 ml με διάμετρο 8 cm. Κατάλληλα είναι και άλλα δοχεία, αλλά θα πρέπει να εξασφαλίζουν ένα κατάλληλο βάθος υπερκείμενου νερού και ιζήματος. Η επιφάνεια του ιζήματος θα πρέπει να επαρκεί για την παροχή 2 έως 3 cm^2 ανά προνύμφη. Η αναλογία του βάθους του ιζήματος προς το βάθος του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι 1:4. Τα δοχεία δοκιμής και ο λοιπός εξοπλισμός που θα έρχονται σε επαφή με το σύστημα δοκιμής θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό (π.χ. Teflon).

Επιλογή είδους

12. Το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή είναι κατά προτίμηση το *Chironomus riparius*. Κατάλληλο είναι και το *Chironomus tentans*, αλλά είναι πιο δύσκολο στη μεταχείριση και απαιτεί μεγαλύτερη διάρκεια δοκιμής. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί το *Chironomus yohimatsui*. Οι λεπτομέρειες των μεθόδων καλλιέργειας του *Chironomus riparius* παρατίθενται στο προσάρτημα 2. Πληροφορίες για τις συνθήκες καλλιέργειας είναι επίσης διαθέσιμες για άλλα είδη, δηλαδή για τα *Chironomus tentans* (4) και *Chironomus yoshimatsui* (11). Η ταυτοποίηση των ειδών πρέπει να επιβεβαιώνεται πριν από τη δοκιμή, ενώ δεν απαιτείται πριν από κάθε δοκιμή, εάν οι οργανισμοί προέρχονται από εσωτερική καλλιέργεια.

Ίζημα

13. Κατά προτίμηση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μορφοποιημένα ιζήματα (που ονομάζονται επίσης ανασυσταθέντα, τεχνητά ή συνθετικά ιζήματα). Ωστόσο, εάν χρησιμοποιείται φυσικό ίζημα, θα πρέπει να έχει χαρακτηριστεί (τουλάχιστον το pH και η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, ενώ συνιστάται επίσης ο προσδιορισμός άλλων παραμέτρων, όπως η αναλογία C/N και η κοκκομετρία), και να είναι απαλλαγμένο από μόλυνση και από άλλους οργανισμούς που θα μπορούσαν να ανταγωνιστούν ή να καταναλώσουν τις χειρονομίδες. Επίσης, πριν από τη χρήση του φυσικού ιζήματος σε δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες, συνιστάται ο εγκλιματισμός του για επτά ημέρες στις συνθήκες που θα επικρατούν στη μετέπειτα δοκιμή. Συνιστάται να χρησιμοποιείται στην παρούσα δοκιμή το ακόλουθο μορφοποιημένο ίζημα (1)(15)(16), το οποίο βασίζεται στο τεχνητό έδαφος που χρησιμοποιείται στη μέθοδο δοκιμών Γ.8 (14):

α) 4-5 % (ξηρό βάρος) τύρφης: pH όσο το δυνατόν πλησιέστερο στην τιμή 5,5 έως 6,0. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται τύρφη σε σκόνη, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων≤ 1 mm) και μόνο αερόξηρη·

β) 20 % (ξηρό βάρος) καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση άνω του 30 %)·

γ) 75-76 % (ξηρό βάρος) χαλαζιακής άμμου (θα πρέπει να επικρατεί η λεπτή άμμος με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μm πάνω από 50 %)·

δ) προστίθεται απιονισμένο νερό για να επιτευχθεί υγρασία του τελικού μείγματος της τάξης του 30-50 %·

ε) προστίθεται ανθρακικό ασβέστιο χημικώς καθαρό ($CaCO_3$) για τη ρύθμιση του pH του τελικού μείγματος του ιζήματος στην τιμή 7,0 ± 0,5. Η περιεκτικότητα του τελικού μείγματος σε οργανικό άνθρακα θα πρέπει να είναι 2 % (± 0,5 %) και να ρυθμίζεται με τη χρήση κατάλληλων ποσοτήτων τύρφης και άμμου, σύμφωνα με τα στοιχεία α) και γ).

14. Η πηγή της τύρφης, καολινιτικής αργίλου και της άμμου θα πρέπει να είναι γνωστή. Τα συστατικά του ιζήματος θα πρέπει να ελέγχονται για απουσία χημικής μόλυνσης (π.χ. βαρέα μέταλλα, οργανοχλωριούχες ενώσεις, οργανοφωσφορικές ενώσεις κ.λπ.). Στο προσάρτημα 3 παρατίθεται παράδειγμα της παρασκευής μορφοποιημένου ιζήματος. Επίσης, επιτρέπεται η ανάμειξη των ξηρών συστατικών, εάν καταδεικνύεται ότι μετά την προσθήκη υπερκείμενου νερού δεν διαχωρίζονται τα συστατικά του ιζήματος (π.χ. επίπλευση σωματιδίων τύρφης) και ότι η τύρφη ή το ίζημα είναι επαρκώς εγκλιματισμένα.

▼M4

Νερό

15. Κάθε νερό που είναι σύμφωνο με τα χημικά χαρακτηριστικά του αποδεκτού νερού αραίωσης, που απαριθμούνται στα προσαρτήματα 2 και 4, είναι κατάλληλο ως νερό δοκιμής. Οποιοδήποτε κατάλληλο νερό, φυσικό (επιφανειακά ή υπόγεια ύδατα), ανασυσταθέν (βλέπε προσάρτημα 2) ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης είναι αποδεκτό ως νερό καλλιέργειας και δοκιμής, εάν οι χειρονομίδες επιβιώνουν σε αυτό καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και των δοκιμών, χωρίς να επιδείξουν σημεία πίεσης. Κατά την έναρξη της δοκιμής, το pH του νερού δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9 και η ολική σκληρότητα να μην υπερβαίνει τα 400 mg/l ως $CaCO_3$. Ωστόσο, εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων σκληρότητας και της ελεγχόμενης ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και ως εκ τούτου, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elendt M4 στην περίπτωση αυτή). Το ίδιο είδος νερού θα πρέπει να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού, που απαριθμούνται στο προσάρτημα 4, πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον δύο φορές ετησίως ή όταν υπάρχουν υπόνοιες για σημαντική μεταβολή τους.

Διαλύματα παρακαταθήκης — Εμβολιασμένα ιζήματα

16. Τα εμβολιασμένα ιζήματα με την επιλεγμένη συγκέντρωση παρασκευάζονται συνήθως με την απευθείας προσθήκη διαλύματος της ελεγχόμενης ουσίας στο ίζημα. Διάλυμα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης ουσίας που έχει διαλυθεί σε απιονισμένο νερό αναμειγνύεται με το μορφοποιημένο ίζημα με τη βοήθεια πρέσας, αναμείκτη τροφών ή χειρωνακτικά. Εάν η ελεγχόμενη ουσία είναι δυσδιάλυτη στο νερό, μπορεί να διαλυθεί σε όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο κατάλληλου οργανικού διαλύτη (π.χ. εξάνιο, ακετόνη ή χλωροφόρμιο). Στη συνέχεια το διάλυμα αυτό αναμειγνύεται με 10 g λεπτής χαλαζιακής άμμου για κάθε δοχείο δοκιμής. Ο διαλύτης αφήνεται να εξατμιστεί και πρέπει να απομακρύνεται εντελώς από την άμμο. Στη συνέχεια, η άμμος αναμειγνύεται με την κατάλληλη ποσότητα ιζήματος ανά ποτήρι δοκιμής. Για τη διαλυτοποίηση, τη διασπορά ή τη γαλακτωματοποίηση της ελεγχόμενης ουσίας μπορούν να χρησιμοποιούνται μόνο μέσα που εξατμίζονται εύκολα. Υπενθυμίζεται ότι, κατά την παρασκευή του ιζήματος, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η άμμος που παρέχεται από το μείγμα ελεγχόμενης ουσίας και άμμου (δηλαδή το ίζημα θα πρέπει επομένως να παρασκευάζεται με λιγότερη άμμο). Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η ελεγχόμενη ουσία που προστίθεται στο ίζημα είναι πλήρως και ομοιογενώς κατανεμημένη μέσα στο ίζημα. Εάν είναι απαραίτητο, μπορούν να αναλύονται επιμέρους δείγματα για τον προσδιορισμό του βαθμού ομοιογένειας.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

17. Ο σχεδιασμός της δοκιμής αφορά την επιλογή του αριθμού και της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής, του αριθμού των δοχείων για κάθε συγκέντρωση και του αριθμού των προνυμφών ανά δοχείο. Περιγράφονται σχεδιασμοί για την εκτίμηση του σημείου EC, την εκτίμηση της NOEC και τη διεξαγωγή οριακής δοκιμής.

Σχεδιασμός για την ανάλυση παλινδρόμησης

18. Η συγκέντρωση επίδρασης (π.χ. EC_{15}, EC_{50}) και το εύρος συγκεντρώσεων που ενδιαφέρουν σε σχέση με την επίδραση της ελεγχόμενης ουσίας θα πρέπει να καλύπτονται από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Γενικώς, η ορθότητα και ιδίως η εγκυρότητα, με την οποία μπορούν να εκτιμηθούν οι συγκεντρώσεις επίδρασης (EC_x), βελτιώνονται όταν η συγκέντρωση επίδρασης περικλείεται στο εύρος των συγκεντρώσεων δοκιμής. Θα πρέπει να αποφεύγεται η παρέκταση πολύ χαμηλότερα από την κατώτατη θετική συγκέντρωση ή πάνω από την ανώτατη συγκέντρωση. Για την επιλογή του πεδίου τιμών των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν, χρήσιμη είναι η προκαταρκτική δοκιμή καθορισμού εύρους (βλέπε παράγραφο 27).

▼M4

19. Εάν πρόκειται να εκτιμηθεί η EC_x, θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις και τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Σε κάθε περίπτωση, συνιστάται η χρησιμοποίηση επαρκών συγκεντρώσεων για την ικανοποιητική εκτίμηση βάσει μοντέλου. Ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2 (εξαίρεση θα μπορούσε να γίνει σε περιπτώσεις που η καμπύλη δόσης-απόκρισης έχει μικρή κλίση). Ο αριθμός των επαναλήψεων σε κάθε αγωγή μπορεί να μειωθεί, εάν αυξάνεται ο αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής με διαφορετικές αποκρίσεις. Η αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων ή η μείωση του μεγέθους των διαστημάτων ανάμεσα στις συγκεντρώσεις δοκιμής τείνει να οδηγεί σε στενότερα διαστήματα εμπιστοσύνης για τη δοκιμή. Σε περίπτωση που πρέπει να εκτιμηθεί η δεκαήμερη επιβίωση και ανάπτυξη των προνυμφών, απαιτούνται πρόσθετα δείγματα επανάληψης.

Σχεδιασμός για την εκτίμηση NOEC/LOEC

20. Εάν πρόκειται να εκτιμηθεί η LOEC ή NOEC, πρέπει να χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής με τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις και ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2. Ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι επαρκής ώστε να εξασφαλίζεται κατάλληλη στατιστική ισχύς για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα με επίπεδο σημαντικότητας 5 % (p = 0,05). Για τον ρυθμό ανάπτυξης είναι συνήθως κατάλληλη μια ανάλυση της διασποράς (ANOVA), όπως οι δοκιμασίες Dunnett και Williams (17)(18)(19)(20). Για τον λόγο εμφάνισης, μπορούν να χρησιμοποιούνται οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher exact (με διόρθωση κατά Bonferroni) ή Mantel-Haenszel.

Οριακή δοκιμή

21. Εάν δεν έχει παρατηρηθεί καμία επίδραση στην προκαταρκτική δοκιμή καθορισμού εύρους, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή (μία συγκέντρωση δοκιμής και ένας μάρτυρας). Σκοπός της οριακής δοκιμής είναι η δοκιμή σε συγκέντρωση αρκετά υψηλή ώστε να επιτρέπει στους ιθύνοντες να αποκλείσουν πιθανές τοξικές επιδράσεις της ελεγχόμενης ουσίας, ενώ το όριο τίθεται σε συγκέντρωση η οποία δεν αναμένεται να εμφανιστεί σε καμία περίπτωση. Συνιστάται η συγκέντρωση 1 000 mg/kg (ξηρό βάρος). Συνήθως, χρειάζονται τουλάχιστον έξι επαναλήψεις, τόσο για την αγωγή όσο και για τον μάρτυρα. Θα πρέπει να καταδεικνύεται επαρκής στατιστική ισχύς για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα με επίπεδο σημαντικότητας 5 % (p = 0,05). Με μετρική απόκριση (ρυθμός ανάπτυξης και βάρος), η δοκιμασία t είναι κατάλληλη στατιστική μέθοδος, εάν τα δεδομένα πληρούν τις απαιτήσεις της (κανονικότητα, ομοιογενείς διασπορές). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t άνισης διασποράς ή μια μη παραμετρική δοκιμασία, όπως η Wilcoxon-Mann-Whithey. Για τον λόγο εμφάνισης, είναι κατάλληλη η δοκιμασία Fisher exact.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες έκθεσης

Ετοιμασία του συστήματος εμβολιασμένου ιζήματος-νερού

22. Για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας συνιστάται η διαδικασία εμβολιασμού που περιγράφεται στη μέθοδο δοκιμών Γ.8 «Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες» (14). Τα εμβολιασμένα ιζήματα τοποθετούνται στα δοχεία και προστίθεται υπερκείμενο νερό για να επιτευχθεί αναλογία όγκων ιζήματος-νερού 1:4 (βλέπε παραγράφους 11 και 15). Το βάθος του στρώματος ιζήματος θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1,5 και 3 cm. Για να αποφεύγεται ο διαχωρισμός των συστατικών του ιζήματος και η επαναιώρηση του λεπτόκοκκου υλικού κατά τη διάρκεια της προσθήκης νερού δοκιμής στη στήλη ύδατος, μπορεί να καλύπτεται το ίζημα με πλαστικό δίσκο, ενώ το νερό χύνεται επάνω σε αυτό, και αμέσως μετά να αφαιρείται ο δίσκος. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες συσκευές.

23. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να καλύπτονται (π.χ. με γυάλινες πλάκες). Εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να συμπληρώνεται το νερό μέχρι τον αρχικό όγκο ώστε να αναπληρώνεται η εξάτμιση του νερού. Αυτό θα πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό για να αποτρέπεται η συσσώρευση αλάτων.

▼M4

Σταθεροποίηση

24. Μετά την ετοιμασία του εμβολιασμένου ιζήματος με το υπερκείμενο νερό, είναι σκόπιμο να παρέχεται ένα χρονικό περιθώριο για την κατανομή της ελεγχόμενης ουσίας μεταξύ υδατικής φάσης και ιζήματος (3)(4)(6)(13). Αυτό θα πρέπει να γίνεται κατά προτίμηση υπό τις συνθήκες θερμοκρασίας και αερισμού που εφαρμόζονται στη δοκιμή. Ο κατάλληλος χρόνος εξισορρόπησης είναι ειδικός για τα ιζήματα και τις χημικές ενώσεις και μπορεί να κυμαίνεται από ώρες έως ημέρες και, σε σπάνιες περιπτώσεις, έως αρκετές εβδομάδες (4-5 εβδομάδες). Δεδομένου οι χρόνοι αυτοί επιτρέπουν την αποικοδόμηση πολλών χημικών ουσιών, δεν αναμένεται η επίτευξη ισορροπίας, αλλά συνιστάται 48ωρη περίοδος εξισορρόπησης. Στο τέλος αυτής της νέας περιόδου εξισορρόπησης, θα πρέπει να μετράται η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στο υπερκείμενο νερό, το ενδοπορικό νερό και στο ίζημα, τουλάχιστον στα δοχεία με την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση (βλέπε παράγραφο 38). Οι εν λόγω αναλυτικοί προσδιορισμοί της ελεγχόμενης ουσίας επιτρέπουν τον υπολογισμό του ισοζυγίου μάζας και την έκφραση των αποτελεσμάτων με βάση τις μετρούμενες συγκεντρώσεις.

Προσθήκη των οργανισμών δοκιμής

25. Τέσσερις έως πέντε ημέρες πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής στα δοχεία δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνονται μάζες αυγών από τις καλλιέργειες και να τοποθετούνται σε μικρά δοχεία με μέσο καλλιέργειας. Μπορεί να χρησιμοποιείται παλαιό μέσο από την αρχική καλλιέργεια ή προσφάτως παρασκευασμένο. Στη δεύτερη περίπτωση, πρέπει να προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας μια μικρή ποσότητα τροφής π.χ. πράσινα φύκη και/ή λίγες σταγόνες διηθήματος από ένα εναιώρημα λεπτοαλεσμένων νιφάδων τροφής για ψάρια (βλέπε προσάρτημα 2). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μάζες μόνο φρέσκων αυγών. Κανονικά, οι προνύμφες αρχίζουν να εκκολάπτονται λίγες ημέρες μετά την τοποθέτηση των αυγών (2 έως 3 ημέρες για το *Chironomus riparius* στους 20 °C και 1 έως 4 ημέρες για το *Chironomus tentans* στους 23 °C και για το *Chironomus yoshimatui* στους 25 °C) και αναπτύσσονται σε τέσσερα στάδια, διάρκειας 4-8 ημερών το καθένα. Για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται προνύμφες πρώτου σταδίου (2-3 ή 1-4 ημέρες μετά την εκκόλαψη). Το στάδιο των χειρονόμων μπορεί να εξακριβωθεί από το πλάτος της κεφαλικής κάψας (6).

26. Είκοσι προνύμφες πρώτου σταδίου κατανέμονται τυχαία, με αμβλύ σιφώνιο, σε κάθε δοχείο δοκιμής που περιέχει το εμβολιασμένο ίζημα και νερό. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης των προνυμφών στα δοχεία δοκιμής, ο αερισμός του νερού πρέπει να διακόπτεται και να μην επαναρχίζει προτού παρέλθουν 24 ώρες από την προσθήκη των προνυμφών (βλέπε παραγράφους 25 και 32). Σύμφωνα με τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό της δοκιμής (βλέπε παραγράφους 19 και 20), ο αριθμός των προνυμφών που χρησιμοποιούνται ανά συγκέντρωση είναι τουλάχιστον 60 για την εκτίμηση του σημείου EC και 80 για τον προσδιορισμό της NOEC.

Συγκεντρώσεις δοκιμής

27. Η διεξαγωγή δοκιμής καθορισμού εύρους ενδέχεται να είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό του εύρους συγκεντρώσεων της οριστικής δοκιμής. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια σειρά από συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας με μεγάλα διαστήματα μεταξύ τους. Προκειμένου να παρέχεται η ίδια πυκνότητα επιφάνειας ανά χειρονομίδα με εκείνη που θα χρησιμοποιηθεί στην οριστική δοκιμή, οι χειρονομίδες εκτίθενται σε κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας για χρονικό διάστημα που επιτρέπει την εκτίμηση των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής, ενώ δεν απαιτούνται επαναλήψεις.

28. Οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν στην οριστική δοκιμή αποφασίζονται με βάση το αποτέλεσμα της δοκιμής καθορισμού εύρους. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, επιλεγόμενες όπως περιγράφεται στις παραγράφους 18 έως 20.

▼**M4**

Μάρτυρες

29. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται στη δοκιμή δοχεία-μάρτυρες, που δεν περιέχουν την ελεγχόμενη ουσία, αλλά περιέχουν ίζημα, με τον κατάλληλο αριθμό επαναλήψεων (βλέπε παραγράφους 19-20). Εάν έχει χρησιμοποιηθεί διαλύτης για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας (βλέπε παράγραφο 16), θα πρέπει να προστίθεται ένας μάρτυρας για τον διαλύτη του ιζήματος.

Σύστημα δοκιμής

30. Χρησιμοποιούνται στατικά συστήματα. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιούνται ημιστατικά συστήματα ή συστήματα συνεχούς ροής με διαλείπουσα ή συνεχή ανανέωση του υπερκείμενου νερού, για παράδειγμα εάν οι προδιαγραφές ποιότητας του νερού καταστούν ακατάλληλες για τον οργανισμό δοκιμής ή επηρεάζουν τη χημική ισορροπία (π.χ. εάν μειωθούν πολύ τα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου, αυξηθεί πολύ η συγκέντρωση προϊόντων απέκκρισης ή στραγγίζουν από το ίζημα ανόργανα άλατα που επηρεάζουν το pH και/ή τη σκληρότητα του νερού). Ωστόσο, κατά κανόνα επαρκούν και προτιμώνται άλλες μέθοδοι για τη βελτίωση της ποιότητας του υπερκείμενου νερού, όπως ο αερισμός.

Διατροφή

31. Η παροχή τροφής στις προνύμφες είναι απαραίτητη, κατά προτίμηση καθημερινά ή τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα. Η τροφή για ψάρια (εναιώρημα σε νερό ή λεπτοαλεσμένη τροφή, π.χ. TetraMin ή TetraPhyll, βλέπε λεπτομέρειες στο προσάρτημα 2), σε ποσότητα 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg για το είδος *C. yoshimatui*) ανά προνύμφη ανά ημέρα θα πρέπει να είναι επαρκής για τις νεαρές προνύμφες κατά τις πρώτες 10 ημέρες. Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορεί να χρειάζονται ελαφρώς περισσότερη τροφή: 0,5 έως 1 mg ανά προνύμφη ανά ημέρα είναι επαρκής ποσότητα για το υπόλοιπο της δοκιμής. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να μειώνεται σε κάθε αγωγή και στους μάρτυρες, σε περίπτωση που αναπτύσσονται μύκητες ή παρατηρείται θνησιμότητα στους μάρτυρες. Εάν η ανάπτυξη μυκήτων δεν μπορεί να ανακοπεί, η δοκιμή πρέπει να επαναλαμβάνεται. Κατά τη δοκιμή ουσιών ισχυρής προσρόφησης (π.χ. με log K_{ow} > 5) ή ουσιών που συνδέονται με το ίζημα με ομοιοπολικούς δεσμούς, η ποσότητα τροφής που απαιτείται για να διασφαλιστεί η επιβίωση και η φυσική ανάπτυξη των οργανισμών μπορεί να προστεθεί στο μορφοποιημένο ίζημα πριν από την περίοδο σταθεροποίησης. Για τον σκοπό αυτό, πρέπει να χρησιμοποιείται φυτικό υλικό αντί της τροφής για ψάρια, π.χ. προσθήκη 0,5 % (ξηρό βάρος) λεπτοαλεσμένων φύλλων τσουκνίδας (*Urtica dioica*), μουριάς (*Morus alba*), λευκού τριφυλλιού (*Trifolium repens*), σπανακιού (*Spinacia oleracea*) ή άλλων φυτικών υλών (*Cerophyl* ή α-κυτταρίνη).

Συνθήκες επώασης

32. Παρέχεται ήπιος αερισμός του υπερκείμενου νερού στα δοχεία δοκιμής, κατά προτίμηση 24 ώρες μετά την προσθήκη των νυμφών, ο οποίος συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής (πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου να μη μειώνεται σε επίπεδα κάτω από το 60 % της ASV). Ο αερισμός παρέχεται μέσω από ένα γυάλινου σιφωνίου Pasteur που στερεώνεται σε ύψος 2-3 cm πάνω από το στρώμα του ιζήματος (δηλαδή μία ή μερικές φυσαλίδες/δευτερόλεπτο). Κατά τη δοκιμή πτητικών χημικών ουσιών, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο μη αερισμού του συστήματος ιζήματος-νερού.

33. Η δοκιμή διεξάγεται σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C (± 2 °C). Για τα *C. tentans* και *C. yoshimatui* οι συνιστώμενες θερμοκρασίες είναι 23 °C και 25 °C (± 2 °C), αντιστοίχως. Εφαρμόζεται φωτοπερίοδος 16 ωρών και η φωτεινή ισχύς θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 500 και 1 000 Lux.

▼M4

Διάρκεια έκθεσης

34. Η έκθεση αρχίζει με την προσθήκη των προνυμφών στα εμβολιασμένα δοχεία και στα δοχεία-μάρτυρες. Η μέγιστη διάρκεια έκθεσης είναι 28 ημέρες για τα *C. riparius* και *C. yoshimatsui* και 65 ημέρες για το *C. tentans*. Σε περίπτωση εμφάνισης χειρονόμων νωρίτερα, η δοκιμή μπορεί να τερματιστεί μετά παρέλευση τουλάχιστον πέντε ημερών από την εμφάνιση του τελευταίου ενήλικα στο δοχείο-μάρτυρα.

Παρατηρήσεις

Εμφάνιση

35. Προσδιορίζονται ο χρόνος ανάπτυξης και ο συνολικός αριθμός των πλήρως ανεπτυγμένων αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων. Τα αρσενικά έντομα αναγνωρίζονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους.

36. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα για την οπτική αξιολόγηση κάθε μη φυσιολογικής συμπεριφοράς (π.χ. εγκατάλειψη του ιζήματος, ασυνήθιστη κολύμβηση), σε σύγκριση με το δοχείο-μάρτυρα. Κατά την περίοδο της αναμενόμενης εμφάνισης είναι απαραίτητη η καθημερινή καταμέτρηση των εμφανιζόμενων χειρονόμων. Καταγράφονται καθημερινά το φύλο και ο αριθμός των πλήρως ανεπτυγμένων χειρονόμων. Μετά την αναγνώριση οι χειρονόμοι αφαιρούνται από τα δοχεία. Τυχόν μάζες αυγών που έχουν εναποτεθεί πριν από τον τερματισμό της δοκιμής πρέπει να καταγράφονται και, στη συνέχεια, να απομακρύνονται για να αποτρέπεται η επανεισαγωγή προνυμφών στο ίζημα. Επίσης, καταγράφεται ο αριθμός των ορατών χρυσαλλίδων που δεν τελειοποιήθηκαν. Στο προσάρτημα 5 παρέχονται κατευθύνσεις σχετικά με τη μέτρηση της εμφάνισης.

Ανάπτυξη και επιβίωση

37. Εάν πρέπει να παρέχονται δεδομένα σχετικά με τη 10ήμερη επιβίωση και ανάπτυξη των προνυμφών, θα πρέπει να προβλέπονται πρόσθετα δοχεία δοκιμής κατά την έναρξη της δοκιμής, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αργότερα. Το ίζημα από αυτά τα πρόσθετα δοχεία κοσκινίζεται με κόσκινο των 250 μm για να συγκρατηθούν οι προνύμφες. Τα κριτήρια βάσει των οποίων διαπιστώνεται ο θάνατος είναι η ακινησία ή η απουσία αντίδρασης σε μηχανικό ερέθισμα. Οι προνύμφες που δεν ανακτώνται θα πρέπει επίσης να καταμετρώνται ως νεκρές (οι προνύμφες που πεθαίνουν στην αρχή της δοκιμής μπορεί να αποικοδομηθούν από μικρόβια). Προσδιορίζεται το ξηρό βάρος (χωρίς τέφρα) των επιζωσών προνυμφών ανά δοχείο δοκιμής και υπολογίζεται το μέσο ξηρό βάρος ανά άτομο ανά δοχείο. Είναι χρήσιμο να προσδιορίζεται το στάδιο ανάπτυξης των προνυμφών που επιβιώνουν. Προς τούτο μπορεί να χρησιμεύσει η μέτρηση του πλάτους της κεφαλικής κάψας κάθε προνύμφης.

Αναλυτικές μετρήσεις

Συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας

38. Πριν από την έναρξη της δοκιμής (δηλαδή την προσθήκη των προνυμφών), λαμβάνονται δείγματα της κύριας μάζας του ιζήματος από τουλάχιστον ένα δοχείο ανά αγωγή, για τον αναλυτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στο ίζημα. Συνιστάται η ανάλυση, τουλάχιστον, δειγμάτων του υπερκείμενου νερού, του ενδοπορικού νερού και του ιζήματος στην αρχή (βλέπε παράγραφο 24) και στο τέλος της δοκιμής, στην υψηλότερη και στη χαμηλότερη συγκέντρωση. Οι συγκεκριμένοι προσδιορισμοί της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά/κατανομή της στο σύστημα νερού-ιζήματος.

39. Όταν εκτελούνται ενδιάμεσες μετρήσεις (π.χ. την 7η ημέρα) και εάν για την ανάλυση απαιτούνται μεγάλα δείγματα τα οποία δεν μπορούν να ληφθούν από τα δοχεία δοκιμής χωρίς να επηρεαστεί το σύστημα δοκιμής, πρέπει να εκτελούνται αναλυτικοί προσδιορισμοί σε δείγματα από πρόσθετα δοχεία δοκιμής που υποβάλλονται στην ίδια αγωγή (συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας των οργανισμών δοκιμής), αλλά δεν χρησιμοποιούνται για βιολογικές παρατηρήσεις.

▼M4

40. Η φυγοκέντρηση, π.χ. σε 10 000 g και 4 °C για 30 λεπτά, αποτελεί τη συνιστώμενη διαδικασία για την απομόνωση του ενδοπορικού νερού. Ωστόσο, εάν καταδεικνύεται ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν προσροφάται στα φίλτρα, είναι αποδεκτή η διήθηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μην είναι δυνατόν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις στο ενδοπορικό νερό, καθώς το μέγεθος του δείγματος είναι υπερβολικά μικρό.

Φυσικοχημικές παράμετροι

41. Θα πρέπει να μετρώνται το pH και η θερμοκρασία των δοχείων δοκιμής με κατάλληλο τρόπο (βλέπε παράγραφο 10). Η σκληρότητα και η αμμωνία θα πρέπει να μετρώνται στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο δοκιμής στην υψηλότερη συγκέντρωση, στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

42. Σκοπός της παρούσας δοκιμής είναι ο προσδιορισμός της επίδρασης της ελεγχόμενης ουσίας στον ρυθμό ανάπτυξης και τον συνολικό αριθμό των πλήρως αναπτυχθέντων αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων ή, στην περίπτωση της 10ήμερης δοκιμής, ο προσδιορισμός των επιδράσεων στην επιβίωση και το βάρος των προνυμφών. Εάν δεν υπάρχουν ενδείξεις για στατιστικά διαφορετικές ευαισθησίες των φύλων, τα αποτελέσματα για τα αρσενικά και τα θηλυκά έντομα μπορούν να συνενώνονται για τις στατιστικές αναλύσεις. Οι διαφορές ευαισθησίας μεταξύ των φύλων μπορούν να κριθούν στατιστικά, π.χ. με δοκιμασία πίνακα χ^2-r × 2. Η επιβίωση των προνυμφών και το μέσο ξηρό βάρος ανά άτομο ανά δοχείο πρέπει να προσδιορίζονται μετά από 10 ημέρες, όπου απαιτείται.

43. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται επίδραση, εκφραζόμενες και βασιζόμενες στο ξηρό βάρος, υπολογίζονται κατά προτίμηση από τις συγκεντρώσεις στα ιζήματα οι οποίες μετρώνται κατά την έναρξη της δοκιμής (βλέπε παράγραφο 38).

44. Για τον υπολογισμό των σημείων των τιμών της EC_{50} ή οποιασδήποτε άλλης EC_x, μπορούν να χρησιμοποιούνται τα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο ως πραγματικές επαναλήψεις. Κατά τον υπολογισμό διαστήματος εμπιστοσύνης για οποιαδήποτε EC_x, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων ή να αποδεικνύεται ότι αυτή είναι τόσο μικρή, ώστε να μπορεί να αγνοηθεί. Όταν η προσαρμογή του μοντέλου γίνεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός στα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο προκειμένου να βελτιώνεται η ομοιογένεια της διασποράς. Ωστόσο, οι τιμές EC_x θα πρέπει να υπολογίζονται αφού μετασχηματιστεί εκ νέου η απόκριση.

45. Όταν η στατιστική ανάλυση στοχεύει στον προσδιορισμό της NOEC/LOEC μέσω δοκιμασίας υπόθεσης, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων, π.χ. μέσω φωλιασμένης (εγκλωβισμένης) ANOVA. Εναλλακτικά, ενδέχεται να είναι κατάλληλες πιο ανθεκτικές δοκιμασίες (21), σε περιπτώσεις όπου παραβιάζονται οι συνήθεις παραδοχές της ANOVA.

Λόγος εμφάνισης

46. Οι λόγοι εμφάνισης είναι ποσοστιαία δεδομένα που μπορούν να αναλυθούν με τη δοκιμασία Cochran-Armitage, εφαρμοζόμενη καθοδικά, όπου αναμένεται μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης και τα δεδομένα αυτά συνάδουν με τη συγκεκριμένη προσδοκία. Σε αντίθετη περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια δοκιμασία Fisher's exact ή Mantel-Haenszel, με διόρθωση των τιμών p κατά Bonferroni-Holm. Εάν υπάρχουν ενδείξεις για μεταβλητότητα μεταξύ των επαναλήψεων στο πλαίσιο της ίδιας συγκέντρωσης, η οποία είναι μεγαλύτερη από εκείνη που θα έδειχνε μια διωνυμική κατανομή (συχνά αναφέρεται ως «εξωδιωνυμική» διασπορά), θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια ανθεκτική δοκιμασία Cochran-Armitage ή Fisher exact, όπως η προτεινόμενη στη βιβλιογραφική παραπομπή (21).

▼**M4**

Πprοσδιορίζεται το άθροισμα των χειρονόμων που εμφανίζονται ανά δοχείο, ne, και διαιρείται διά του αριθμού των εισαγόμενων προνυμφών, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

όπου:

ER = λόγος εμφάνισης

n_e = αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο

n_a = αριθμός προνυμφών που εισήχθησαν ανά δοχείο

47. Μια εναλλακτική λύση, που είναι η πλέον κατάλληλη για δείγματα μεγάλου μεγέθους, όταν υπάρχει εξωδιωνυμική διασπορά, είναι να θεωρείται ο δείκτης εμφάνισης ως συνεχής απόκριση και να χρησιμοποιούνται διαδικασίες όπως η δοκιμασία William, όταν αναμένεται μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης και συνάδει με αυτά τα δεδομένα για τον ER. Η δοκιμασία Dunnett είναι κατάλληλη σε περιπτώσεις που δεν ισχύει η μονοτονικότητα. Εν προκειμένω, το δείγμα μεγάλου μεγέθους ορίζεται ως αριθμός μεγαλύτερος του 5 ανά επανάληψη (δοχείο), τόσο για τα άτομα που εμφανίζονται όσο και για εκείνα που δεν εμφανίζονται.

48. Για την εφαρμογή των μεθόδων ANOVA, οι τιμές του ER θα πρέπει πρώτα να μετασχηματίζονται με μετασχηματισμό της τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου ή με τον μετασχηματισμό Freeman-Tukey για την επίτευξη μιας κατά προσέγγιση κανονικής κατανομής και την εξίσωση των διασπορών. Οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher's exact (Bonferroni) και Mantel-Haenszel μπορούν να εφαρμοστούν όταν χρησιμοποιούνται απόλυτες συχνότητες. Ο μετασχηματισμός της τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου εφαρμόζεται λαμβάνοντας το αντίστροφο του ημιτόνου ($\sin^{-1}$) της τετραγωνικής ρίζας του ER.

49. Για τους λόγους εμφάνισης, οι τιμές EC_x υπολογίζονται με ανάλυση παλινδρόμησης [ή, π.χ., με probit (22), logit, Weibull, κατάλληλο λογισμικό του εμπορίου κ.λπ.]. Εάν η ανάλυση παλινδρόμησης αποτύχει (π.χ. όταν υπάρχουν λιγότερες από δύο μερικές αποκρίσεις), χρησιμοποιούνται άλλες, μη παραμετρικές μέθοδοι, όπως ο κινητός μέσος (όρος) ή η απλή παρεμβολή.

Ρυθμός ανάπτυξης

50. Ο μέσος χρόνος ανάπτυξης αντιπροσωπεύει το μέσο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εισαγωγή των προνυμφών (ημέρα 0 της δοκιμής) έως την εμφάνιση της πειραματικής κοόρτης χειρονόμων. (Για τον υπολογισμό του πραγματικού χρόνου ανάπτυξης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ηλικία των προνυμφών κατά τον χρόνο της εισαγωγής). Ο ρυθμός ανάπτυξης ισούται με το αντίστροφο του χρόνου ανάπτυξης (μονάδα: 1/ημέρα) και αντιπροσωπεύει το ημερήσιο τμήμα της ανάπτυξης των προνυμφών. Ο ρυθμός ανάπτυξης προτιμάται για την αξιολόγηση των παρουσών μελετών τοξικότητας σε ίζημα, καθώς παρουσιάζει μικρότερη διασπορά, είναι πιο ομοιογενής και προσεγγίζει περισσότερο την κανονική κατανομή σε σύγκριση με τον χρόνο ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, οι ισχυρές παραμετρικές δοκιμασίες μπορούν να εφαρμόζονται στον ρυθμό ανάπτυξης αντί του χρόνου ανάπτυξης. Για τον ρυθμό ανάπτυξης ως συνεχή απόκριση, οι τιμές EC_x μπορούν να υπολογίζονται με ανάλυση παλινδρόμησης [π.χ. (23)(24)].

51. Για τις ακόλουθες στατιστικές δοκιμασίες, ο αριθμός χειρονόμων που παρατηρήθηκε κατά την ημέρα επιθεώρησης × υποτίθεται ότι εμφανίστηκε στο μέσο χρονικό διάστημα μεταξύ της ημέρας x και της ημέρας x - 1 (1 = διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης, συνήθως 1 ημέρα). Ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

όπου:

$\bar{x}$: μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο

i: δείκτης του διαστήματος επιθεώρησης

m: μέγιστος αριθμός διαστημάτων επιθεώρησης

f_i: αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα επιθεώρησης i

n_e: συνολικός αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν στο τέλος του πειράματος ($=\sum f_i$)

x_i: ρυθμός ανάπτυξης των χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα i

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{ημέρα}_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

όπου:

ημέρα_i: ημέρα επιθεώρησης (ημέρες από την εφαρμογή)

l_i: διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης i (ημέρες, συνήθως 1 ημέρα)

Έκθεση δοκιμής

52. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική κατάσταση και, εάν έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες [υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, συντελεστής κατανομής στο έδαφος (ή στο ίζημα, εάν είναι διαθέσιμος), σταθερότητα στο νερό κ.λπ.],

— στοιχεία ταυτοποίησης χημικής ουσίας (κοινή ονομασία, χημική ονομασία, συντακτικός τύπος, αριθμός CAS κ.λπ.), συμπεριλαμβανομένων της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας.

Υπό δοκιμή είδος:

— πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν: είδος, επιστημονική ονομασία, πηγή των οργανισμών και συνθήκες αναπαραγωγής,

— πληροφορίες σχετικά με τη μεταχείριση των μαζών αυγών και προνυμφών,

— ηλικία των ζώων κατά τον χρόνο εισαγωγής τους στα δοχεία δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— ίζημα που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή φυσικό ή μορφοποιημένο,

— για τα φυσικά ιζήματα, τοποθεσία και περιγραφή του σημείου δειγματοληψίας του ιζήματος, συμπεριλαμβανομένου, εάν είναι δυνατόν, του ιστορικού μόλυνσης χαρακτηριστικά: pH, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, αναλογία C/N και κοκκομετρία (κατά περίπτωση),

— παρασκευή του μορφοποιημένου ιζήματος: συστατικά και χαρακτηριστικά (περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, pH, υγρασία κ.λπ. κατά την έναρξη της δοκιμής),

— παρασκευή του νερού δοκιμής (εάν χρησιμοποιείται ανασυσταθέν νερό) και τα χαρακτηριστικά του (συγκέντρωση οξυγόνου, pH, αγωγιμότητα, σκληρότητα κ.λπ. κατά την έναρξη της δοκιμής),

— βάθος του ιζήματος και του υπερκείμενου νερού,

— όγκος του υπερκείμενου και του ενδοπορικού νερού βάρος του υγρού ιζήματος με και χωρίς ενδοπορικό νερό,

▼M4

— δοχεία δοκιμής (υλικό και μέγεθος,

— μέθοδος εμβολιασμού του ιζήματος: συγκεντρώσεις δοκιμής που χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός επαναλήψεων και χρήση διαλύτη, εάν έγινε,

— φάση σταθεροποίησης της ισορροπίας του συστήματος εμβολιασμένου ιζήματος-νερού: διάρκεια και συνθήκες,

— συνθήκες επώασης: θερμοκρασία, φωτοπερίοδος και φωτεινή ισχύς, αερισμός (συχνότητα και ένταση),

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη διατροφή, μεταξύ των οποίων είδος της τροφής, παρασκευή, ποσότητα και καθεστώς σίτισης.

Αποτελέσματα:

— ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μετρηθείσες συγκεντρώσεις δοκιμής και τα αποτελέσματα όλων των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στο δοχείο δοκιμής,

— ποιότητα του νερού στο εσωτερικό των δοχείων δοκιμής, δηλαδή pH, θερμοκρασία, διαλυμένο οξυγόνο, σκληρότητα και αμμωνία,

— αναπλήρωση εξατμισθέντος νερού δοκιμής, εάν υπήρξε,

— αριθμός των αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο και ανά ημέρα,

— αριθμός των προνυμφών που δεν εμφανίστηκαν ως τέλειοι χειρονόμοι ανά δοχείο,

— μέσο ξηρό βάρος των προνυμφών ανά άτομο, ανά δοχείο και ανά στάδιο ανάπτυξης, ανάλογα με την περίπτωση,

— ποσοστιαία εμφάνιση ανά δοχείο επανάληψης και συγκέντρωση δοκιμής (συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους),

— μέσος ρυθμός ανάπτυξης των πλήρως αναπτυχθέντων χειρονόμων ανά δοχείο επανάληψης και αγωγή (συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους),

— εκτιμήσεις των τοξικών καταληκτικών σημείων, π.χ. ECx (και τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης), NOEC και/ή LOEC, και οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τους,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης τυχόν αποκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) BBA (1995), Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R et al. (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission, Report No: EC 3738, August 1994, WRc, UK.

(3) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002), Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, pp 1125-1241, στο ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology, Pesticides, ASTM, International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32, December 1997.

▼**M4**

(6) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J. και Kirby R.S. (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986), Fundamental studies on Chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30ης September 1995.

(14) Μέθοδος δοκιμών Γ.8 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

(15) Suedel B.C. και Rodgers J.H. (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.

(16) Naylor C. και Rodrigues C. (1995), Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment, *Chemosphere* 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *J. Amer. Statis. Assoc.* 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K. και Scott A.J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48: 577-585.

(22) Christensen E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Research* 18: 213-221.

(23) Bruce και Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485-1494.

(24) Slob W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints, *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Μορφοποιημένο ίζημα ή ανασυσταθέν, τεχνητό ή συνθετικό ίζημα είναι ένα μείγμα υλικών που χρησιμοποιείται για να απομιμείται τα φυσικά συστατικά ενός φυσικού ιζήματος.

Υπερκείμενο νερό είναι το νερό που τοποθετείται πάνω από το ίζημα στο δοχείο δοκιμής.

Διάμεσο νερό ή ενδοπορικό νερό είναι το νερό που καταλαμβάνει τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων του ιζήματος και του εδάφους.

Εμβολιασμένο ίζημα είναι το ίζημα στο οποίο έχει προστεθεί η ελεγχόμενη ουσία.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M4

Προσάρτημα 2

Συστάσεις για την καλλιέργεια του *Chironomus riparius*

1. Οι προνύμφες του γένους Chironomus μπορούν να εκτρέφονται σε δοχεία κρυστάλλωσης ή μεγαλύτερα. Λεπτή χαλαζιακή άμμος απλώνεται σε λεπτό στρώμα βάθους περίπου 5 έως 10 mm πάνω στον πυθμένα του δοχείου. Το Kieselguhr (π.χ. Merck, Art 8117) έχει επίσης αποδειχθεί κατάλληλο υπόστρωμα (επαρκεί ένα λεπτότερο στρώμα πάχους πολύ λίγων mm). Στη συνέχεια, προστίθεται επαρκής ποσότητα νερού σε βάθος αρκετών εκατοστών. Η στάθμη του νερού θα πρέπει να συμπληρώνεται, όσο χρειάζεται, για την αναπλήρωση των απωλειών λόγω εξάτμισης, καθώς και για την πρόληψη της αποξήρανσης. Το νερό μπορεί να αντικαθίσταται, εάν είναι απαραίτητο. Θα πρέπει να παρέχεται ήπιος αερισμός. Τα δοχεία εκτροφής των προνυμφών θα πρέπει να είναι τοποθετημένα σε κατάλληλο κλωβό που να αποτρέπει τη διαφυγή των εμφανιζόμενων ενηλίκων. Ο κλωβός πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος για να επιτρέπει στα εμφανιζόμενα ενήλικα έντομα να σχηματίζουν σμήνος, γιατί διαφορετικά δεν είναι δυνατή η συνουσία (οι ελάχιστες διαστάσεις είναι περίπου 30 × 30 × 30 cm).

2. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου ή σε χώρο σταθερού περιβάλλοντος, στους 20 + 2 °C, με φωτοπερίοδο 16 ωρών (φωτεινή ισχύς περίπου 1 000 lux). Έχει αναφερθεί ότι υγρασία του αέρα μικρότερη από 60 % RH μπορεί να εμποδίσει την αναπαραγωγή.

Νερό αραίωσης

3. Μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοδήποτε κατάλληλο φυσικό ή συνθετικό νερό. Συνήθως χρησιμοποιούνται νερό γεώτρησης, αποχλωριωμένο νερό βρύσης και τεχνητά μέσα (π.χ. θρεπτικό υλικό Elendt «M4» ή «M7», βλέπε κατωτέρω). Το νερό πρέπει να αερίζεται πριν από τη χρήση. Εάν είναι απαραίτητο, το νερό καλλιέργειας μπορεί να ανανεώνεται με έκχυση ή σιφωνισμό του χρησιμοποιημένου νερού από τα δοχεία καλλιέργειας, με προσοχή, χωρίς να καταστρέφονται οι σωλήνες των προνυμφών.

Σίτιση προνυμφών

4. Οι προνύμφες του γένους Chironomus πρέπει να τρέφονται με τροφή για ψάρια σε νιφάδες (TetraMin, TetraPhyll ή άλλη παρόμοια τροφή για ψάρια με κατοχυρωμένο εμπορικό σήμα), σε ποσότητα περίπου 250 mg ανά δοχείο ανά ημέρα. Η τροφή αυτή μπορεί να χορηγείται ως ξηρή αλεσμένη σκόνη ή ως εναιώρημα σε νερό: 1,0 g νιφάδων τροφής προστίθενται σε 20 ml νερού αραίωσης και αναμειγνύεται για να προκύψει ένα ομοιογενές μείγμα. Το παρασκεύασμα αυτό μπορεί να χορηγείται με ρυθμό περίπου 5 ml ανά δοχείο ανά ημέρα (ανακινείται πριν από τη χρήση). Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορούν να λαμβάνουν μεγαλύτερες ποσότητες.

5. Η σίτιση ρυθμίζεται ανάλογα με την ποιότητα του νερού. Εάν το μέσο καλλιέργειας «θολώσει», η σίτιση θα πρέπει να μειωθεί. Οι προσθήκες τροφής θα πρέπει να παρακολουθούνται επισταμένως. Η υπερβολικά μικρή ποσότητα τροφής θα προκαλέσει μετανάστευση των προνυμφών προς τη στήλη ύδατος, ενώ η υπερβολικά μεγάλη ποσότητα θα προκαλέσει αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα και μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου. Οι συνθήκες αυτές μπορούν να οδηγήσουν και οι δύο σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης.

6. Μπορούν επίσης να προστίθενται κύτταρα ορισμένων πράσινων φυκών (π.χ. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), όταν ετοιμάζονται νέα δοχεία καλλιέργειας.

Σίτιση ενηλίκων

7. Ορισμένοι πειραματιστές έχουν προτείνει τον εμποτισμό ενός τεμαχίου βαμβακιού με κορεσμένο διάλυμα σακχαρόζης για να χρησιμεύσει ως τροφή των εμφανιζόμενων ενήλικων εντόμων.

▼M4

Εμφάνιση

8. Στους 20 ± 2 °C θα αρχίσουν να εξέρχονται ενήλικα έντομα από τα δοχεία εκτροφής προνυμφών μετά από περίπου 13-15 ημέρες. Τα αρσενικά διακρίνονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους.

Μάζες αυγών

9. Μόλις εμφανιστούν ενήλικα έντομα μέσα στον κλωβό αναπαραγωγής, όλα τα δοχεία εκτροφής προνυμφών θα πρέπει να ελέγχονται τρεις φορές την εβδομάδα για απόθεση των ζελατινωδών μαζών αυγών. Εάν υπάρχουν μάζες αυγών, πρέπει να αφαιρούνται προσεκτικά και να μεταφέρονται σε έναν μικρό δίσκο που περιέχει δείγμα του νερού αναπαραγωγής. Οι μάζες αυγών χρησιμοποιούνται για την έναρξη καλλιέργειας σε νέο δοχείο (π.χ. 2-4 μάζες αυγών/δοχείο) ή για δοκιμές τοξικότητας.

10. Οι προνύμφες πρώτου σταδίου πρέπει να εκκολάπτονται μετά από 2-3 ημέρες.

Τοποθέτηση νέων δοχείων καλλιέργειας

11. Από τη στιγμή που οι καλλιέργειες έχουν εγκατασταθεί, υπάρχει δυνατότητα ετοιμασίας νέων δοχείων καλλιέργειας προνυμφών ανά εβδομάδα ή λιγότερο συχνά, ανάλογα με τις απαιτήσεις της δοκιμής, αφαιρουμένων των παλαιότερων δοχείων μετά την εμφάνιση των ενήλικων χειρονόμων. Με τη χρήση του συστήματος αυτού, θα παράγεται μια κανονική ποσότητα ενηλίκων με την ελάχιστη δυνατή διαχείριση.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής «M4» και «M7»

12. Ο Elendt (1990) έχει περιγράψει το θρεπτικό υλικό «M4». Το θρεπτικό υλικό «M7» παρασκευάζεται όπως και το «M4» εκτός από τις ουσίες που αναφέρονται στον πίνακα 1, για τις οποίες οι συγκεντρώσεις στο «M7» είναι υποτετραπλάσιες εκείνων του «M4». Συνάσσεται επί του παρόντος δημοσίευση για το θρεπτικό υλικό «M7» (Elendt, προσωπική επικοινωνία). Το διάλυμα δοκιμής δεν πρέπει να παρασκευάζεται σύμφωνα με τους Elendt και Bias (1990), επειδή οι συγκεντρώσεις $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 και K_2HPO_4 που υποδεικνύονται για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης δεν είναι επαρκείς.

Παρασκευή του θρεπτικού υλικού «M7»

13. Κάθε διάλυμα παρακαταθήκης (I) παρασκευάζεται χωριστά και από τα εν λόγω διαλύματα (I) παρασκευάζεται συνδυασμένο διάλυμα παρακαταθήκης (II) (βλέπε πίνακα 1). Πενήντα ml συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II) αναμειγνύονται με τις ποσότητες κάθε διαλύματος παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών που εμφαίνονται στον πίνακα 2 και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο με απιονισμένο νερό για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού «M7». Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών με την προσθήκη τριών βιταμινών σε απιονισμένο νερό όπως υποδεικνύεται στον πίνακα 3, και 0,1 ml από το διάλυμα παρακαταθήκης συνδυασμού βιταμινών προστίθενται στο τελικό θρεπτικό υλικό «M7» λίγο πριν από τη χρήση (το διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών αποθηκεύεται κατεψυγμένο σε μικρά κλάσματα). Το θρεπτικό υλικό αερίζεται και σταθεροποιείται.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H.Köpp, Berlin 1995.

▼**M4**

Πίνακας 1

Διαλύματα παρακαταθήκης ιχνοστοιχείων για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

Διάλυμα παρακαταθήκης (I)	Ποσότητα (mg) που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό	Για την παρασκευή του συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II): αναμειγνύονται οι ακόλουθες ποσότητες (ml) διαλυμάτων παρακαταθήκης (I) και συμπληρώνεται ο όγκος έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό		Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Οι ουσίες αυτές διαφέρουν μεταξύ του M4 και του M7, όπως αναφέρεται ανωτέρω.
(2) Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται χωριστά, ενώνονται και αποστειρώνονται αμέσως σε αυτόκαυστο.

Πίνακας 2

Διαλύματα παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

	Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg)	Ποσότητα διαλυμάτων παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l)	Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Πίνακας 3

Διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7. Συνδυάζονται και τα τρία διαλύματα βιταμινών για την παρασκευή ενιαίου διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών

	Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg)	Ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l)	Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l)
Υδροχλωρική θειαμίνη	750	0,1	0,075
Κυανοκοβαλαμίνη (B12)	10	0,1	0,0010
Βιοτίνη	7,5	0,1	0,00075

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Elendt B.P. (1990), Selenium Deficiency in Crustacean, *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. και Bias W.-R. (1990), Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*, *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Προσάρτημα 3

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

Σύνθεση του ιζήματος

Η σύνθεση του μορφοποιημένου ιζήματος θα πρέπει να έχει ως εξής:

Συστατικά	Χαρακτηριστικά	% επί του ξηρού βάρους του ιζήματος
Τύρφη	Τύρφη σφάγνων, με pH όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο 5,5-6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 1 mm) και αερόξηρη	4 - 5
Χαλαζιακή άμμος	Μέγεθος κόκκων: > 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να έχει μέγεθος 50-200 μm	75 - 76
Καολινιτική άργιλος	Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 %	20
Οργανικός άνθρακας	Ρυθμίζεται με προσθήκη τύρφης και άμμου	2 (± 0,5)
Ανθρακικό ασβέστιο	$CaCO_3$, κονιοποιημένο, χημικά καθαρό	0,05 - 0,1
Νερό	Αγωγιμότητα ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Προετοιμασία

Η τύρφη ξηραίνεται στον αέρα και αλέθεται σε λεπτή σκόνη. Παρασκευάζεται εναιώρημα της απαιτούμενης ποσότητας σκόνης τύρφης σε απιονισμένο νερό με τη βοήθεια ομοιογενοποιητή υψηλής απόδοσης. Το pH του εν λόγω εναιωρήματος ρυθμίζεται στο 5,5 ± 0,5 με $CaCO_3$. Το εναιώρημα εγκλιματίζεται τουλάχιστον για δύο ημέρες με ήπια ανάδευση στους 20 ± 2 °C, για τη σταθεροποίηση του pH και τη δημιουργία σταθερού μικροβιακού συστατικού. Το pH μετράται εκ νέου και θα πρέπει να είναι 6,0 ± 0,5. Στη συνέχεια, το εναιώρημα τύρφης αναμειγνύεται με τα άλλα συστατικά (άμμος και καολινιτική άργιλος) και με απιονισμένο νερό για να ληφθεί ένα ομοιογενές ίζημα με περιεκτικότητα σε νερό 30-50 % επί του ξηρού βάρους του ιζήματος. Το pH του τελικού μείγματος μετράται και πάλι και ρυθμίζεται σε 6,5 έως 7,5 με $CaCO_3$, εάν είναι απαραίτητο. Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα. Στη συνέχεια, πριν από τη χρήση του ιζήματος στη δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες, συνιστάται ο εγκλιματισμός του μορφοποιημένου ιζήματος για επτά ημέρες υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή.

Αποθήκευση

Τα ξηρά συστατικά για την παρασκευή του τεχνητού ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται σε ξηρό και δροσερό χώρο, σε θερμοκρασία δωματίου. Το μορφοποιημένο (υγρό) ίζημα δεν πρέπει να αποθηκεύεται πριν από τη χρήση του στη δοκιμή. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την πάροδο των 7 ημερών εγκλιματισμού με τον οποίο ολοκληρώνεται η παρασκευή του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media, *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

▼**M4**

Προσάρτημα 4

Χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραίωσης

Ουσία	Συγκεντρώσεις
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Σκληρότητα ως $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

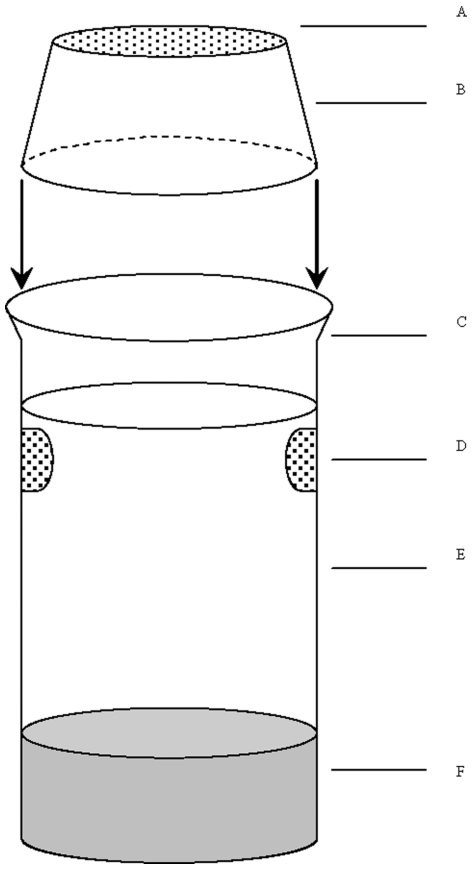
(*) Ωστόσο, σημειώνεται ότι εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της ελεγχόμενης ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και, ως εκ τούτου, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elendt M4 σε αυτή την περίπτωση).

▼**M4**

Προσάρτημα 5

Κατευθύνσεις για την παρακολούθηση της εξόδου των προνυμφών χειρονομίδων

Τοποθετούνται παγίδες εξόδου στα ποτήρια ζέσεως της δοκιμής. Οι παγίδες αυτές χρειάζονται από την 20ή ημέρα έως το τέλος της δοκιμής. Ένα παράδειγμα χρησιμοποιούμενης παγίδας αναπαρίσταται κατωτέρω:



A: σίτα από νάιλον

B: ανεστραμμένα πλαστικά ποτήρια

C: ποτήρι έκθεσης χωρίς χείλος

D: έξοδοι σίτας για την ανταλλαγή νερού

E: νερό

F: ίζημα

▼M4

Γ. 28. ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΧΕΙΡΟΝΟΜΙΔΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ-ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΝΕΡΟΥ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή TG 219 (2004) του ΟΟΣΑ. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η εκτίμηση των επιδράσεων της παρατεταμένης έκθεσης χημικών ουσιών στις προνύμφες των ειδών δίπτερων *Chironomus sp.* των γλυκών υδάτων οι οποίεσυ διαβιούν σε ιζήματα. Βασίζεται κατά κύριο λόγο στην κατευθυντήρια γραμμή του BBA (Γερμανικό ομοσπονδιακό βιολογικό κέντρο ερευνών γεωργίας και δασοκομίας), σύμφωνα με την οποία χρησιμοποιείται ένα δοκιμαστικό σύστημα νερού-ιζήματος με τεχνητό έδαφος και ένα σενάριο έκθεσης σε στήλη ύδατος (1). Στη μέθοδο έχουν επίσης ληφθεί υπόψη τα υπάρχοντα πρωτόκολλα δοκιμών τοξικότητας για τα είδη *Chironomus riparius* και *Chironomus tentans* που έχουν καταρτιστεί στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) και έχουν υποβληθεί σε κυκλική δοκιμή (1)(6)(9). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη χειρονομίδων για τα οποία υπάρχει επαρκής τεκμηρίωση, π.χ. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Το σενάριο έκθεσης που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο είναι ο εμβολιασμός του νερού. Η επιλογή του κατάλληλου σεναρίου έκθεσης εξαρτάται από την επιδιωκόμενη εφαρμογή της δοκιμής. Το σενάριο της έκθεσης στο νερό, που περιλαμβάνει εμβολιασμό της στήλης ύδατος, σκοπό έχει να προσομοιώσει ένα περιστατικό μετακίνησης ψεκαστικού νέφους φυτοφαρμάκων και καλύπτει το αρχικό μέγιστο των συγκεντρώσεων στο ενδοπορικό νερό. Επίσης, εξυπηρετεί και άλλους τύπους έκθεσης (συμπεριλαμβανομένων των χημικών διαρροών), εκτός των διαδικασιών συσσώρευσης, των οποίων η διάρκεια υπερβαίνει τη διάρκεια της δοκιμής.

3. Οι ουσίες που πρέπει να ελέγχονται ως προς οργανισμούς που διαβιούν σε ιζήματα συνήθως παραμένουν σε αυτό το διαμέρισμα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Οι οργανισμοί που διαβιούν σε ιζήματα ενδέχεται να εκτίθενται μέσω διάφορων οδών. Η σχετική σημασία της κάθε οδού έκθεσης, καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για να συμβάλει στις συνολικές τοξικές επιδράσεις, εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της εκάστοτε χημικής ουσίας. Για ουσίες ισχυρής προσρόφησης (π.χ. με $\log K_{ow} > 5$) ή για ουσίες που συνδέονται με ιζήματα με ομοιοπολικούς δεσμούς, η πρόσληψη μολυσμένων τροφών μπορεί να είναι μια σημαντική οδός έκθεσης. Προκειμένου να μην υποτιμάται η τοξικότητα των εξαιρετικά λιπόφιλων ουσιών, μπορεί να εξετάζεται η προσθήκη της τροφής στο ίζημα πριν από την εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Για να ληφθούν υπόψη όλες οι πιθανές οδοί έκθεσης, η παρούσα μέθοδος δοκιμών εστιάζει στη μακροχρόνια έκθεση. Η διάρκεια της δοκιμής κυμαίνεται μεταξύ 20 και 28 ημερών για τα *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, και από 28 έως 65 ημέρες για τα *C. tentans*. Εάν απαιτούνται βραχυπρόθεσμα δεδομένα για ένα συγκεκριμένο σκοπό, όπως για τη διευρεύνηση των επιδράσεων ασταθών χημικών ουσιών, μπορούν να αποσύρονται πρόσθετα δοχεία επανάληψης μετά από μια περίοδο δέκα ημερών.

4. Τα μετρούμενα καταληκτικά σημεία είναι ο συνολικός αριθμός εμφανιζόμενων ενηλίκων εντόμων και ο χρόνος μέχρι την εμφάνιση. Συνιστάται να εκτελούνται οι μετρήσεις της επιβίωσης και ανάπτυξης των προνυμφών μόνο μετά από ένα δεκαήμερο, εάν απαιτούνται πρόσθετα βραχυπρόθεσμα δεδομένα, με τη χρήση των κατάλληλων πρόσθετων δοχείων επανάληψης.

5. Συνιστάται η χρήση μορφοποιημένου ιζήματος, το οποίο παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα φυσικά ιζήματα:

— η πειραματική μεταβλητότητα μειώνεται, επειδή σχηματίζει μια αναπαραγόμενη «τυποποιημένη μήτρα» και εκλείπει η ανάγκη εξεύρεσης πηγών αμόλυντου και καθαρού ιζήματος,

— οι δοκιμές μπορούν να αρχίζουν ανά πάσα στιγμή, χωρίς να αντιμετωπίζουν εποχιακή μεταβλητότητα του ιζήματος δοκιμής και δεν απαιτείται προκατεργασία του ιζήματος για την απομάκρυνση της αυτόχθονης πανίδας. Με τη χρήση μορφοποιημένων ιζημάτων μειώνεται επίσης το κόστος που συνεπάγεται η συλλογή επαρκών ποσοτήτων ιζημάτων από το ύπαιθρο για δοκιμές ρουτίνας,

▼M4

— η χρήση μορφοποιημένου ιζήματος καθιστά δυνατές τις συγκρίσεις τοξικότητας και την ανάλογη κατάταξη των ουσιών: τα δεδομένα τοξικότητας από δοκιμές με φυσικά και τεχνητά ιζήματα ήταν συγκρίσιμα για διάφορες χημικές ουσίες (2).

6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Προνύμφες χειρονομίδων πρώτου σταδίου εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας σε συστήματα ιζήματος-νερού. Η δοκιμή αρχίζει με την τοποθέτηση των προνυμφών πρώτου σταδίου στα ποτήρια ζέσεως που περιέχουν το σύστημα ιζήματος-νερού και στη συνέχεια εμβολιάζεται η ελεγχόμενη ουσία στο νερό. Η εμφάνιση και ο ρυθμός ανάπτυξης των χειρονομίδων μετρώνται στο τέλος της δοκιμής. Η επιβίωση και το βάρος των προνυμφών μπορούν επίσης να μετρώνται μετά από 10 ημέρες, εάν απαιτείται (με τη χρήση των κατάλληλων πρόσθετων δοχείων επανάληψης). Αυτά τα δεδομένα αναλύονται με τη χρήση είτε ενός μοντέλου παλινδρόμησης, ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει × % μείωση της εμφάνισης ενηλίκων εντόμων ή της επιβίωσης ή ανάπτυξης των προνυμφών (π.χ. EC_{15}, EC_{50} κ.λπ.), είτε δοκιμασιών στατιστικής υπόθεσης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC) ή της κατώτατης συγκέντρωσης παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC). Στη δεύτερη περίπτωση απαιτείται σύγκριση μεταξύ των τιμών επίδρασης και των τιμών των μαρτύρων, με τη χρήση στατιστικών δοκιμασιών.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

8. Θα πρέπει να είναι γνωστές η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της ελεγχόμενης ουσίας, η μετρούμενη ή υπολογιζόμενη κατανομή της στο ίζημα και η σταθερότητά της στο νερό και το ίζημα. Θα πρέπει να διατίθεται μια αξιόπιστη μέθοδος ανάλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας στο υπερκείμενο νερό, στο ενδοπορικό νερό και στο ίζημα, με γνωστή και δημοσιευμένη ορθότητα (accuracy) και όριο ανίχνευσης. Στις χρήσιμες πληροφορίες συγκαταλέγονται ο συντακτικός τύπος και η καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας. Χρήσιμο στοιχείο είναι επίσης η χημική πορεία της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. διασπορά, βιοτική και αβιοτική αποικοδόμηση κ.λπ.). Περαιτέρω καθοδήγηση για τις δοκιμές ουσιών με φυσικοχημικές ιδιότητες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής παρέχεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (12).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας του πρωτοκόλλου και των συνθηκών δοκιμής, μπορούν να ελέγχονται περιοδικά χημικές ουσίες αναφοράς. Μερικές από τις τοξικές ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιούνται με επιτυχία σε κυκλικές δοκιμές και μελέτες επικύρωσης είναι το λινδάνιο, η τριφλουραλίνη, η πενταχλωροφαινόλη, το χλωριούχο κάδμιο και το χλωριούχο κάλιο (1)(2)(5)(6)(13).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Για να θεωρηθεί έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

— το ποσοστό εμφάνισης στους μάρτυρες πρέπει να ανέρχεται σε τουλάχιστον 70 % στο τέλος της δοκιμής (1)(6),

— η εμφάνιση ενηλίκων *C. riparius* και *C. yoshimatsui* στα δοχεία μάρτυρες θα πρέπει να σημειώνεται μεταξύ της 12ης και της 23ης ημέρας από την εισαγωγή τους στα δοχεία. Για το *C. tentans* απαιτείται περίοδος 20 έως 65 ημερών,

— στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να μετρώνται το pH και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε κάθε δοχείο. Η συγκέντρωση οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 60 % της τιμής κορεσμού του αέρα (ASV) στη χρησιμοποιούμενη θερμοκρασία και το pH του υπερκείμενου νερού να είναι της τάξης του 6-9 σε όλα τα δοχεία δοκιμής,

▼M4

— η θερμοκρασία του νερού δεν πρέπει να διαφέρει κατά περισσότερο από ± 1,0 °C. Η θερμοκρασία του νερού μπορεί να ελέγχεται μέσω ισοθερμικού δωματίου, οπότε η θερμοκρασία δωματίου πρέπει να επιβεβαιώνεται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Δοχεία δοκιμής

11. Η μελέτη διεξάγεται σε ποτήρια ζέσεως των 600 ml με διάμετρο 8 cm. Κατάλληλα είναι και άλλα δοχεία, αλλά θα πρέπει να εξασφαλίζουν κατάλληλο βάθος υπερκείμενου νερού και ιζήματος. Η επιφάνεια του ιζήματος θα πρέπει να είναι επαρκής για την παροχή 2 έως 3 cm^2 ανά προνύμφη. Η αναλογία του βάθους του ιζήματος προς το βάθος του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι 1:4. Τα δοχεία δοκιμής και ο λοιπός εξοπλισμός που θα έρχονται σε επαφή με το σύστημα δοκιμής θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό (π.χ. Teflon).

Επιλογή είδους

12. Το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή είναι κατά προτίμηση το *Chironomus riparius*. Κατάλληλο είναι επίσης το *Chironomus tentans*, αλλά είναι πιο δύσκολο στη μεταχείριση και απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα δοκιμής. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί το *Chironomus yohimatsui*. Οι λεπτομέρειες των μεθόδων καλλιέργειας του *Chironomus riparius* παρατίθενται στο προσάρτημα 2. Πληροφορίες για τις συνθήκες καλλιέργειας είναι επίσης διαθέσιμες για άλλα είδη, δηλαδή τα *Chironomus tentans* (4) και *Chironomus yoshimatsui* (11). Η ταυτοποίηση των ειδών πρέπει να επιβεβαιώνεται πριν από τη δοκιμή, ενώ δεν απαιτείται πριν από κάθε δοκιμή, εάν οι οργανισμοί προέρχονται από εσωτερική καλλιέργεια.

Ίζημα

13. Κατά προτίμηση, πρέπει να χρησιμοποιούνται μορφοποιημένα ιζήματα (που ονομάζονται επίσης ανασυσταθέντα, τεχνητά ή συνθετικά ιζήματα). Ωστόσο, εάν χρησιμοποιείται φυσικό ίζημα, πρέπει να έχει χαρακτηριστεί (τουλάχιστον το pH, η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, ενώ συνιστάται επίσης ο προσδιορισμός άλλων παραμέτρων, όπως η αναλογία C/N και η κοκκομετρία) και να είναι απαλλαγμένο από τυχόν μόλυνση και άλλους οργανισμούς που θα μπορούσαν να ανταγωνιστούν ή να καταναλώσουν τις χειρονομίδες. Επίσης, πριν από τη χρήση του φυσικού ιζήματος σε δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες, συνιστάται ο εγκλιματισμός του για επτά ημέρες υπό τις συνθήκες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή. Συνιστάται για χρήση στην παρούσα δοκιμή το ακόλουθο μορφοποιημένο ίζημα (1)(15)(16), το οποίο βασίζεται στο τεχνητό έδαφος που χρησιμοποιείται στη μέθοδο δοκιμών Γ.8 (14):

α) 4-5 % (ξηρό βάρος) τύρφης: pH όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο 5,5 έως 6,0. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται τύρφη σε μορφή σκόνης, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 1 mm) και μόνο αερόξηρη·

β) 20 % (ξηρό βάρος) καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση άνω του 30 %)·

γ) 75-76 % (ξηρό βάρος) χαλαζιακής άμμου (θα πρέπει να επικρατεί η λεπτή άμμος, με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μm πάνω από 50 %)·

δ) προστίθεται απιονισμένο νερό για να επιτευχθεί υγρασία του τελικού μείγματος της τάξης 30-50 %·

ε) προστίθεται ανθρακικό ασβέστιο χημικώς καθαρό ($CaCO_3$) για τη ρύθμιση του pH του τελικού μείγματος του ιζήματος σε 7,0 ± 0,5·

στ) η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα του τελικού μείγματος θα πρέπει να είναι 2 % (± 0,5 %), και να ρυθμίζεται με τη χρήση κατάλληλων ποσοτήτων τύρφης και άμμου, σύμφωνα με τα στοιχεία α) και γ).

▼M4

14. Η πηγή της τύρφης, της καολινιτικής αργίλου και της άμμου θα πρέπει να είναι γνωστή. Τα συστατικά των ιζημάτων θα πρέπει να ελέγχονται για απουσία χημικής μόλυνσης (π.χ. βαρέα μέταλλα, οργανοχλωριωμένες ενώσεις, οργανοφωσφορικές ενώσεις κ.λπ.). Στο προσάρτημα 3, παρατίθεται παράδειγμα παρασκευής μορφοποιημένου ιζήματος. Επίσης, επιτρέπεται η ανάμειξη των ξηρών συστατικών, εάν καταδεικνύεται ότι, μετά την προσθήκη υπερκείμενου νερού, δεν διαχωρίζονται τα συστατικά του ιζήματος (π.χ. επίπλευση σωματιδίων τύρφης) και ότι η τύρφη ή το ίζημα είναι επαρκώς εγκλιματισμένα.

Νερό

15. Κάθε νερό που είναι σύμφωνο με τα χημικά χαρακτηριστικά του αποδεκτού νερού αραίωσης, τα οποία απαριθμούνται στα προσαρτήματα 2 και 4, είναι κατάλληλο ως νερό δοκιμής. Οποιοδήποτε κατάλληλο νερό, φυσικό (επιφανειακά ή υπόγεια ύδατα), ανασυσταθέν (βλέπε προσάρτημα 2) ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης είναι αποδεκτό ως νερό καλλιέργειας και δοκιμής, εάν οι χειρονομίδες επιβιώνουν σε αυτό καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και των δοκιμών χωρίς να επιδείξουν σημεία πίεσης. Κατά την έναρξη της δοκιμής, το pH του νερού δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9 και η συνολική σκληρότητα να μην είναι μεγαλύτερη από 400 mg/l ως $CaCO_3$. Ωστόσο, εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της ελεγχόμενης ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και ως εκ τούτου, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elendt M4 στην περίπτωση αυτή). Το ίδιο είδος νερού θα πρέπει να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού, που απαριθμούνται στο προσάρτημα 4, πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον δύο φορές ετησίως ή όταν υπάρχουν υπόνοιες για σημαντική μεταβολή τους.

Διαλύματα παρακαταθήκης — Εμβολιασμένο νερό

16. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής υπολογίζονται βάσει των συγκεντρώσεων στη στήλη ύδατος, δηλαδή στο νερό που υπέρκειται του ιζήματος. Τα διαλύματα δοκιμής των επιλεγμένων συγκεντρώσεων παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση ενός διαλύματος παρακαταθήκης. Τα διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζονται με διάλυση της ελεγχόμενης ουσίας δοκιμής στο μέσο δοκιμής. Η χρήση διαλυτών ή μέσων διασποράς μπορεί να είναι απαραίτητη σε ορισμένες περιπτώσεις, προκειμένου να παρασκευασθεί ένα κατάλληλα συμπυκνωμένο διάλυμα παρακαταθήκης. Στους διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιούνται περιλαμβάνονται η ακετόνη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, ο μονοαιθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, ο διμεθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη. Μέσα διασποράς που μπορούν να χρησιμοποιούνται είναι το Cremophor RH40, το Tween 80, η μεθυλοκυτταρίνη 0,01 % και HCO-40. Η συγκέντρωση του μέσου διαλυτοποίησης στο τελικό μέσο δοκιμής θα πρέπει να είναι ελάχιστη (δηλαδή ≤ 0,1 ml/l) και η ίδια σε κάθε αγωγή. Όταν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, αυτό δεν πρέπει να έχει σημαντικές επιδράσεις στην επιβίωση ή ορατή δυσμενή επίδραση στις προνύμφες των χειρονομίδων, όπως γίνεται αντιληπτό με μάρτυρα που περιέχει μόνο διαλύτη. Εντούτοις, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή της χρήσης τέτοιων υλικών.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

17. Ο σχεδιασμός της δοκιμής αφορά την επιλογή του αριθμού και της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής, του αριθμού των δοχείων για κάθε συγκέντρωση και του αριθμού των προνυμφών ανά δοχείο. Περιγράφονται σχεδιασμοί για την εκτίμηση του σημείου EC, την εκτίμηση της NOEC και τη διεξαγωγή οριακής δοκιμής. Η ανάλυση παλινδρόμησης προτιμάται έναντι της προσέγγισης της δοκιμασίας υποθέσεων.

Σχεδιασμός για ανάλυση παλινδρόμησης

18. Η συγκέντρωση επίδρασης (π.χ. EC_{15}, EC_{50}) και το εύρος συγκεντρώσεων που ενδιαφέρουν σε σχέση με την επίδραση της ελεγχόμενης ουσίας, θα πρέπει να καλύπτονται από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Γενικώς, η ορθότητα και ιδίως η εγκυρότητα με την οποία μπορούν να εκτιμηθούν οι συγκεντρώσεις επίδρασης (EC_x), βελτιώνονται όταν η συγκέντρωση επίδρασης περικλείεται στο εύρος συγκεντρώσεων της δοκιμής. Θα πρέπει να αποφεύγεται η παρέκταση πολύ χαμηλότερα από την

▼M4

κατώτατη θετική συγκέντρωση ή πάνω από την υψηλότερη συγκέντρωση Για την επιλογή του εύρους συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθεί, χρήσιμη είναι η διεξαγωγή προκαταρκτικής δοκιμής καθορισμού εύρους (βλέπε παράγραφο 27).

19. Εάν πρέπει να εκτιμηθεί η EC_x, θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, με τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Σε κάθε περίπτωση, συνιστάται η χρησιμοποίηση επαρκών συγκεντρώσεων για μια ικανοποιητική εκτίμηση βάσει μοντέλου. Ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2 (εξαίρεση θα μπορούσε να γίνει σε περιπτώσεις που η καμπύλη δόσης-απόκρισης έχει μικρή κλίση). Ο αριθμός των επαναλήψεων σε κάθε αγωγή μπορεί να μειώνεται, εάν αυξάνεται ο αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής με διαφορετικές αποκρίσεις. Η αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων ή η μείωση του μεγέθους των διαστημάτων μεταξύ των συγκεντρώσεων δοκιμής τείνει να οδηγεί σε στενότερα διαστήματα εμπιστοσύνης για τη δοκιμή. Σε περίπτωση που πρέπει να εκτιμηθεί η δεκαήμερη επιβίωση και ανάπτυξη των προνυμφών, απαιτούνται πρόσθετα δοχεία επανάληψης.

Σχεδιασμός για την εκτίμηση NOEC/LOEC

20. Εάν πρέπει να εκτιμηθεί η LOEC ή NOEC, πρέπει να χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής με τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις και ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2. Ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι επαρκής για να εξασφαλίζει επαρκή στατιστική ισχύ για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα στο επίπεδο σημαντικότητας 5 % (p = 0,05). Για τον ρυθμό ανάπτυξης, κατάλληλη είναι συνήθως μια ανάλυση διασποράς (ANOVA), όπως οι δοκιμασίες Dunnett και Williams (17)(18)(19)(20). Για τον λόγο εμφάνισης, μπορούν να χρησιμοποιούνται οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher exact (με διόρθωση κατά Bonferroni) και Mantel-Haenszel.

Οριακή δοκιμή

21. Εάν δεν έχει παρατηρηθεί καμία επίδραση στην προκαταρκτική δοκιμή καθορισμού εύρους, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή (μία συγκέντρωση δοκιμής και ένας μάρτυρας),. Σκοπός της οριακής δοκιμής είναι να δείξει ότι η τοξική τιμή της ελεγχόμενης ουσίας είναι μεγαλύτερη από την οριακή συγκέντρωση που ελέγχθηκε. Δεν είναι δυνατόν να υποδειχθεί συνιστώμενη συγκέντρωση στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Αυτό επαφίεται στην κρίση των ιθυνόντων. Συνήθως, χρειάζονται έξι επαναλήψεις, τόσο για την αγωγή όσο και για τον μάρτυρα. Θα πρέπει να καταδεικνύεται επαρκής στατιστική ισχύ για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα με επίπεδο σημαντικότητας 5 % (p = 0,05). Με μετρική απόκριση (ρυθμός ανάπτυξης και βάρος), η δοκιμασία t είναι κατάλληλη στατιστική μέθοδος, εάν τα δεδομένα πληρούν τις απαιτήσεις της (κανονικότητα, ομοιογενείς διασπορές). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t άνισης διασποράς ή μια μη παραμετρική δοκιμασία, όπως η Wilcoxon-Mann-Whithey. Για τον λόγο εμφάνισης, κατάλληλη είναι η δοκιμή Fisher exact.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες έκθεσης

Ετοιμασία του συστήματος εμβολιασμένου νερού-ιζήματος

22. Κατάλληλες ποσότητες μορφοποιημένου ιζήματος (βλέπε παραγράφους 13-14 και προσάρτημα 3) προστίθενται στα δοχεία δοκιμής για να σχηματίσουν ένα στρώμα τουλάχιστον 1,5 cm. Προστίθεται νερό σε βάθος 6 cm (βλέπε παράγραφο 15). Η αναλογία μεταξύ του βάθους του στρώματος ιζήματος και του βάθους του νερού δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1:4 και το στρώμα ιζήματος δεν πρέπει να είναι βαθύτερο από 3 cm. Το σύστημα ιζήματος-νερού θα πρέπει να παραμένει υπό ήπιο αερισμό για επτά ημέρες πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής (βλέπε παράγραφο 14 και προσάρτημα 3). Για να αποφεύγονται ο διαχωρισμός των συστατικών του ιζήματος και η επαναιώρηση του λεπτού υλικού κατά τη διάρκεια της προσθήκης νερού δοκιμής στη στήλη ύδατος, το ίζημα μπορεί να καλύπτεται με έναν πλαστικό δίσκο, ενώ το νερό χύνεται επάνω σε αυτό, και αμέσως μετά να απομακρύνεται ο δίσκος. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες συσκευές.

▼M4

23. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να καλύπτονται (π.χ. με γυάλινες πλάκες). Εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης το νερό θα πρέπει να συμπληρώνεται μέχρι τον αρχικό όγκο ώστε να αναπληρώνεται η εξάτμιση του νερού. Αυτό θα πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό για να αποτρέπεται η συσσώρευση αλάτων.

Προσθήκη των οργανισμών δοκιμής

24. Τέσσερις έως πέντε ημέρες πριν από την προσθήκη των ελεγχόμενων οργανισμών στα δοχεία δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνονται μάζες αυγών από τις καλλιέργειες και να τοποθετούνται σε μικρά δοχεία με το μέσο καλλιέργειας. Μπορεί να χρησιμοποιείται παλαιό μέσο από την αρχική καλλιέργεια ή προσφάτως παρασκευασμένο. Στη δεύτερη περίπτωση, πρέπει να προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας μικρή ποσότητα τροφής π.χ. πράσινα φύκη και/ή λίγες σταγόνες διηθήματος από εναιώρημα λεπτοαλεσμένων νιφάδων τροφής για ψάρια (βλέπε προσάρτημα 2). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο μάζες φρέσκων αυγών. Κανονικά, οι προνύμφες αρχίζουν να εκκολάπτονται λίγες ημέρες μετά την τοποθέτηση των αυγών (2 έως 3 ημέρες για το *Chironomus riparius*, στους 20 °C, και 1 έως 4 ημέρες για το *Chironomus tentans*, στους 23 °C, και το *Chironomus yoshimatui*, στους 25 °C) και αναπτύσσονται σε τέσσερα στάδια, διάρκειας 4-8 ημερών το καθένα. Για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται προνύμφες πρώτου σταδίου (2-3 ή 1-4 ημέρες μετά την εκκόλαψη). Το στάδιο των χειρονόμων μπορεί να εξακριβωθεί από το πλάτος της κεφαλικής κάψας (6).

25. Είκοσι προνύμφες πρώτου σταδίου κατανέμονται τυχαία, με αμβλύ σιφώνιο, σε κάθε δοχείο δοκιμής που περιέχει το εμβολιασμένο ίζημα και το νερό. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης των προνυμφών στα δοχεία δοκιμής, ο αερισμός του νερού πρέπει να διακόπτεται και μην αποκαθίσταται πριν από την παρέλευση 24ώρου από την προσθήκη των προνυμφών (βλέπε παραγράφους 24 και 32). Ανάλογα με τον σχεδιασμό της δοκιμής (βλέπε παραγράφους 19 και 20), ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων προνυμφών ανά συγκέντρωση είναι τουλάχιστον 60 για την εκτίμηση του σημείου EC και 80 για τον προσδιορισμό της NOEC.

26. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη των προνυμφών, η ελεγχόμενη ουσία εμβολιάζεται στην υπερκείμενη στήλη ύδατος και στη συνέχεια παρέχεται και πάλι ήπιος αερισμός. Μικροί όγκοι των διαλυμάτων της ελεγχόμενης ουσίας εφαρμόζονται κάτω από την επιφάνεια του νερού με τη βοήθεια σιφωνίου. Το υπερκείμενο νερό πρέπει στη συνέχεια να αναμειγνύεται με επιμέλεια, ώστε να μη διαταράσσεται το ίζημα.

Συγκεντρώσεις δοκιμής

27. Η διεξαγωγή δοκιμής καθορισμού εύρους ενδέχεται να είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό του πεδίου τιμών των συγκεντρώσεων της οριστικής δοκιμής. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια σειρά από συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας με μεγάλα διαστήματα μεταξύ τους. Προκειμένου να παρέχεται η ίδια πυκνότητα επιφάνειας ανά χειρονομίδα με εκείνη που θα χρησιμοποιηθεί στην οριστική δοκιμή, οι χειρονομίδες εκτίθενται σε κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας για χρονικό διάστημα που επιτρέπει την εκτίμηση των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής, ενώ δεν απαιτούνται επαναλήψεις.

28. Οι συγκεντρώσεις της οριστικής δοκιμής αποφασίζονται με βάση το αποτέλεσμα της δοκιμής καθορισμού εύρους. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, επιλεγόμενες όπως περιγράφεται στις παραγράφους 18 έως 20.

Μάρτυρες

29. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται στη δοκιμή δοχεία μάρτυρες που δεν περιέχουν την ελεγχόμενη ουσία, αλλά περιέχουν ίζημα, με τον κατάλληλο αριθμό επαναλήψεων (βλέπε παραγράφους 19-20). Εάν έχει χρησιμοποιηθεί διαλύτης για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας (βλέπε παράγραφο 16), θα πρέπει να προστίθεται ένας μάρτυρας με διαλύτη ιζήματος.

▼M4

Σύστημα δοκιμής

30. Χρησιμοποιούνται στατικά συστήματα. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ημιστατικά συστήματα ή συστήματα συνεχούς ροής με διαλείπουσα ή συνεχή ανανέωση του υπερκείμενου νερού, για παράδειγμα εάν οι προδιαγραφές ποιότητας του νερού καταστούν ακατάλληλες για τον ελεγχόμενο οργανισμό ή επηρεάζουν τη χημική ισορροπία (π.χ. εάν μειωθούν πολύ τα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου, αυξηθεί πολύ η συγκέντρωση των προϊόντων απέκκρισης ή εάν στραγγίζουν από τα ιζήματα ανόργανα άλατα που επηρεάζουν το pH και/ή τη σκληρότητα του νερού). Ωστόσο, κατά κανόνα επαρκούν και προτιμώνται άλλες μέθοδοι για τη βελτίωση της ποιότητας του υπερκείμενου νερού, όπως ο αερισμός.

Διατροφή

31. Η παροχή τροφής στις προνύμφες είναι απαραίτητη, κατά προτίμηση καθημερινά ή τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα. Η τροφή για ψάρια (εναιώρημα στο νερό ή λεπτοαλεσμένη τροφή, π.χ. TetraMin ή TetraPhyll, βλέπε λεπτομέρειες στο προσάρτημα 2), σε ποσότητα 0,25-0,5 mg (0,35 - 0,5 mg για το *C. yoshimatui*) ανά προνύμφη ανά ημέρα, πρέπει να είναι επαρκής για νεαρές προνύμφες κατά τις πρώτες 10 ημέρες. Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορεί να χρειάζονται ελαφρώς μεγαλύτερες ποσότητες τροφής: 0,5 έως 1 mg ανά προνύμφη ανά ημέρα είναι επαρκής ποσότητα για το υπόλοιπο της δοκιμής. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να μειώνεται σε κάθε αγωγή και στους μάρτυρες σε περίπτωση που αναπτύσσονται μύκητες ή εάν παρατηρείται θνησιμότητα στους μάρτυρες. Εάν η ανάπτυξη μυκήτων δεν μπορεί να ανακοπεί, η δοκιμή πρέπει να επαναλαμβάνεται. Κατά τη δοκιμή ουσιών ισχυρής προσρόφησης (π.χ. με log K_{ow} > 5) ή ουσιών που συνδέονται με το ίζημα με ομοιοπολικούς δεσμούς, η ποσότητα τροφής που απαιτείται για να διασφαλιστεί η επιβίωση και η φυσική ανάπτυξη των οργανισμών μπορεί να προστίθεται στο μορφοποιημένο ίζημα πριν από την περίοδο σταθεροποίησης. Για τον σκοπό αυτό, πρέπει να χρησιμοποιείται φυτικό υλικό αντί της τροφής για ψάρια, π.χ. προσθήκη 0,5 % (ξηρό βάρος) λεπτοαλεσμένων φύλλων, π.χ. τσουκνίδας (*Urtica dioica*), μουριάς (*Morus alba*), λευκού τριφυλλιού (*Trifolium repens*), σπανακιού (*Spinacia oleracea*) ή άλλων φυτικών υλών (*Cerophyl ή άλφα-κυτταρίνη*).

Συνθήκες επώασης

32. Παρέχεται ήπιος αερισμός του υπερκείμενου νερού στα δοχεία δοκιμής, κατά προτίμηση 24 ώρες μετά την προσθήκη των νυμφών και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής (πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου να μη μειώνεται σε επίπεδα κάτω από το 60 % της ASV). Ο αερισμός παρέχεται μέσω γυάλινου σιφωνίου Pasteur που στερεώνεται σε ύψος 2-3 cm πάνω από το στρώμα ιζήματος (δηλαδή μία ή μερικές φυσαλίδες/δευτερόλεπτο). Κατά τη δοκιμή πτητικών χημικών ουσιών, εξετάζεται το ενδεχόμενο μη αερισμού του συστήματος ιζήματος-νερού.

33. Η δοκιμή διεξάγεται σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C (± 2 °C). Για τα *C. tentans* και *C. yoshimatui* οι συνιστώμενες θερμοκρασίες είναι 23 °C και 25 °C (± 2 °C), αντιστοίχως. Εφαρμόζεται φωτοπερίοδος 16 ωρών και η φωτεινή ισχύς θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 500 έως 1 000 Lux.

Διάρκεια έκθεσης

34. Η έκθεση αρχίζει με την προσθήκη των προνυμφών στα εμβολιασμένα δοχεία και στα δοχεία-μάρτυρες. Η μέγιστη διάρκεια της έκθεσης είναι 28 ημέρες για τα *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, και 65 ημέρες για το *C. tentans*. Σε περίπτωση εμφάνισης χειρονόμων νωρίτερα, η δοκιμή μπορεί να τερματιστεί μετά παρέλευση πέντε τουλάχιστον ημερών από την εμφάνιση του τελευταίου ενήλικα στο δοχείο-μάρτυρα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Εμφάνιση

35. Προσδιορίζονται ο χρόνος ανάπτυξης και ο συνολικός αριθμός των πλήρως αναπτυχθέντων αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων. Τα αρσενικά έντομα αναγνωρίζονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους.

▼M4

36. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα με σκοπό την οπτική αξιολόγηση κάθε μη φυσιολογικής συμπεριφοράς (π.χ. εγκατάλειψη του ιζήματος, ασυνήθιστη κολύμβηση), σε σύγκριση με το δοχείο-μάρτυρα. Κατά την περίοδο της αναμενόμενης εμφάνισης είναι απαραίτητη η καθημερινή καταμέτρηση των εμφανιζόμενων χειρονόμων. Καταγράφονται καθημερινά το φύλο και ο αριθμός των πλήρως αναπτυχθέντων χειρονόμων. Μετά την αναγνώριση οι χειρονόμοι απομακρύνονται από τα δοχεία. Τυχόν μάζες αυγών που έχουν εναποτεθεί πριν από τον τερματισμό της δοκιμής πρέπει να καταγράφονται και στη συνέχεια να απομακρύνονται ώστε να αποτρέπεται η εκ νέου εισαγωγή προνυμφών στο ίζημα. Επίσης, καταγράφεται ο αριθμός των ορατών χρυσαλλίδων που δε τελειοποιήθηκαν. Στο προσάρτημα 5 παρέχονται κατευθύνσεις σχετικά με τη μέτρηση της εμφάνισης.

Ανάπτυξη και επιβίωση

37. Εάν πρέπει να παρέχονται δεδομένα σχετικά με τη 10ήμερη επιβίωση και ανάπτυξη των προνυμφών, θα πρέπει να προβλέπονται πρόσθετα δοχεία δοκιμής στην αρχή της δοκιμής, ούτως ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αργότερα. Το ίζημα από αυτά τα πρόσθετα δοχεία κοσκινίζεται με κόσκινο των 250 μm για να συγκρατηθούν οι προνύμφες. Τα κριτήρια βάσει των οποίων διαπιστώνεται ο θάνατος είναι η ακινησία ή η απουσία αντίδρασης σε μηχανικό ερέθισμα. Οι προνύμφες που δεν ανακτώνται θα πρέπει επίσης να καταμετρώνται ως νεκρές (οι προνύμφες που πεθαίνουν στην αρχή της δοκιμής μπορεί να αποικοδομούνται από μικρόβια). Προσδιορίζεται το ξηρό βάρος (χωρίς την τέφρα) των επιζωσών προνυμφών ανά δοχείο δοκιμής και υπολογίζεται το μέσο ξηρό βάρος ανά προνύμφη ανά δοχείο. Είναι χρήσιμο να προσδιορίζεται το στάδιο ανάπτυξης των επιζωσών προνυμφών. Προς τούτο μπορεί να χρησιμεύσει η μέτρηση του πλάτους της κεφαλικής κάψας κάθε προνύμφης.

Αναλυτικές μετρήσεις

Συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας

38. Πρέπει να αναλύονται, τουλάχιστον, δείγματα του υπερκείμενου νερού, του ενδοπορικού νερού και του ιζήματος στην αρχή (κατά προτίμηση μία ώρα μετά την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας) και στο τέλος της δοκιμής, στην υψηλότερη και στη χαμηλότερη συγκέντρωση. Οι συγκεκριμένοι προσδιορισμοί της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά/κατανομή της ελεγχόμενης ουσίας στο σύστημα νερού-ιζήματος. Η δειγματοληψία ιζήματος κατά την έναρξη της δοκιμής μπορεί να επηρεάσει το σύστημα δοκιμής (π.χ. απομάκρυνση προνυμφών δοκιμής), και, επομένως, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επιπλέον δοχεία δοκιμής για την εκτέλεση αναλυτικών προσδιορισμών κατά την έναρξη και κατά τη διάρκεια της δοκιμής, κατά περίπτωση (βλέπε παράγραφο 39). Οι μετρήσεις στο ίζημα μπορεί να μην είναι απαραίτητες, εάν η κατανομή της ελεγχόμενης ουσίας μεταξύ νερού και ιζήματος έχει προσδιοριστεί σαφώς σε μελέτη νερού/ιζήματος υπό ανάλογες συνθήκες (π.χ. αναλογία ιζήματος προς νερό, τύπος εφαρμογής, περιεκτικότητα του ιζήματος σε οργανικό άνθρακα).

39. Όταν εκτελούνται ενδιάμεσες μετρήσεις (π.χ. την 7η ημέρα) και εάν για την ανάλυση απαιτούνται μεγάλα δείγματα τα οποία δεν μπορούν να ληφθούν από τα δοχεία δοκιμής χωρίς να επηρεάσουν το σύστημα δοκιμής, πρέπει να εκτελούνται αναλυτικοί προσδιορισμοί σε δείγματα από πρόσθετα δοχεία δοκιμής που υποβάλλονται στην ίδια αγωγή (συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας των οργανισμών δοκιμής), αλλά δεν χρησιμοποιούνται για βιολογικές παρατηρήσεις.

40. Η φυγοκέντρηση, π.χ. σε 10 000 g και 4 °C για 30 λεπτά, αποτελεί τη συνιστώμενη διαδικασία για την απομόνωση του ενδοπορικού νερού. Ωστόσο, εάν καταδεικνύεται ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν προσροφάται στους ηθμούς, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της διήθησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μην είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με ανάλυση οι συγκεντρώσεις σε ενδοπορικό νερό, καθώς το μέγεθος του δείγματος είναι υπερβολικά μικρό.

▼M4

Φυσικοχημικές παράμετροι

41. Θα πρέπει να μετρώνται με κατάλληλο τρόπο το pH, το διαλυμένο οξυγόνο στο νερό δοκιμής και η θερμοκρασία των δοχείων δοκιμής (βλέπε παράγραφο 10). Η σκληρότητα και η αμμωνία θα πρέπει να μετρώνται στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο δοκιμής στην υψηλότερη συγκέντρωση στην αρχή και το τέλος της δοκιμής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

42. Σκοπός της παρούσας δοκιμής είναι η διαπίστωση της επίδρασης της ελεγχόμενης ουσίας στον ρυθμό ανάπτυξης και τον συνολικό αριθμό των πλήρως αναπτυχθέντων αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων ή, στην περίπτωση της 10ήμερης δοκιμής, η διαπίστωση των επιδράσεων στην επιβίωση και το βάρος των προνυμφών. Εάν δεν υπάρχουν ενδείξεις για στατιστικά διαφορετικές ευαισθησίες των φύλων, τα αποτελέσματα για τα αρσενικά και τα θηλυκά έντομα μπορούν να συνενώνονται για τις στατιστικές αναλύσεις. Οι διαφορές ευαισθησίας μεταξύ των φύλων μπορούν να κριθούν στατιστικά, π.χ. με δοκιμή πίνακα χ^2-r × 2. Η επιβίωση των προνυμφών και το μέσο ξηρό βάρος ανά άτομο ανά δοχείο πρέπει να προσδιορίζονται μετά από 10 ημέρες, όπου απαιτείται.

43. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται επίδραση, εκφραζόμενες ως συγκεντρώσεις στο υπερκείμενο νερό, υπολογίζονται κατά προτίμηση με βάση τις συγκεντρώσεις που μετρώνται κατά την έναρξη της δοκιμής (βλέπε παράγραφο 38).

44. Για την εκτίμηση των σημείων των τιμών της EC_{50} ή οποιασδήποτε άλλης EC_x, μπορούν να χρησιμοποιούνται τα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο ως πραγματικές επαναλήψεις. Κατά τον υπολογισμό διαστήματος εμπιστοσύνης για κάθε EC_x, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων ή να αποδεικνύεται ότι η μεταβλητότητα αυτή είναι τόσο μικρή, ώστε να μπορεί να αγνοηθεί. Όταν η προσαρμογή του μοντέλου γίνεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός στα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο ώστε να βελτιώνεται η ομοιογένεια της διασποράς. Ωστόσο, οι τιμές EC_x θα πρέπει να υπολογίζονται αφού μετασχηματιστεί εκ νέου η απόκριση στην αρχική τιμή.

45. Όταν η στατιστική ανάλυση στοχεύει στον προσδιορισμό της NOEC/LOEC μέσω δοκιμασίας υποθέσεων, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων, π.χ. μέσω φωλιασμένης (εγκλωβισμένης) ANOVA. Εναλλακτικά, μπορεί να είναι κατάλληλες πιο ανθεκτικές δοκιμές (21), σε περιπτώσεις όπου παραβιάζονται οι συνήθεις παραδοχές της ANOVA.

Λόγος εμφάνισης

46. Οι λόγοι εμφάνισης είναι ποσοστιαία δεδομένα που μπορούν να αναλυθούν με δοκιμασία Cochran-Armitage, εφαρμοζόμενη καθοδικά, όπου αναμένεται μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης και τα δεδομένα αυτά συνάδουν με τη συγκεκριμένη προσδοκία. Σε αντίθετη περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια δοκιμή Fisher's exact ή Mantel-Haenszel, με διόρθωση των τιμών p κατά Bonferroni-Holm. Εάν υπάρχουν ενδείξεις για μεταβλητότητα μεταξύ των επαναλήψεων στο πλαίσιο της ίδιας συγκέντρωσης, η οποία είναι μεγαλύτερη από εκείνη που θα έδειχνε μια διωνυμική κατανομή (συχνά αναφέρεται ως «εξωδιωνυμική» διασπορά), θα πρέπει να χρησιμοποιηείται μια ανθεκτική δοκιμή Cochran-Armitage ή Fisher exact, όπως προτείνεται στην παράγραφο (21).

47. Προσδιορίζεται το άθροισμα των χειρονόμων που εμφανίζονται ανά δοχείο, ne, και διαιρείται διά του αριθμού των εισαγόμενων προνυμφών, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼**M4**

όπου:

ER = λόγος εμφάνισης

n_e = αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο

n_a = αριθμός προνυμφών που εισήχθησαν ανά δοχείο

48. Μια εναλλακτική λύση που είναι η πλέον κατάλληλη για δείγματα μεγάλου μεγέθους, όταν υπάρχει εξωδιωνυμική διασπορά, είναι να θεωρείται ο λόγος εμφάνισης ως συνεχής απόκριση και να χρησιμοποιούνται διαδικασίες όπως η δοκιμασία William όταν αναμένεται μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης η οποία συνάδει με αυτά τα δεδομένα για τον ER. Η δοκιμασία Dunnett είναι κατάλληλη σε περιπτώσεις που δεν ισχύει η μονοτονικότητα. Εν προκειμένω, το δείγμα μεγάλου μεγέθους ορίζεται ως αριθμός τόσο των εμφανιζόμενων όσο και των μη εμφανιζόμενων εντόμων μεγαλύτερος του 5 ανά επανάληψη (δοχείο).

49. Για την εφαρμογή των μεθόδων ANOVA οι τιμές του ER θα πρέπει πρώτα να μετασχηματίζονται με μετασχηματισμό τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου ή με μετασχηματισμό Freeman-Tukey για την επίτευξη μιας κατά προσέγγιση κανονικής κατανομής και την εξίσωση των διασπορών. Οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher's exact (Bonferroni) και Mantel-Haenszel μπορούν να εφαρμοστούν όταν χρησιμοποιούνται απόλυτες συχνότητες. Ο μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου εφαρμόζεται λαμβάνοντας το αντίστροφο του ημιτόνου ($\sin^{-1}$) της τετραγωνικής ρίζας του ER.

50. Για τους λόγους εμφάνισης, οι τιμές EC_x υπολογίζονται με ανάλυση παλινδρόμησης (ή, π.χ., με probit (22), logit, Weibull ή κατάλληλο λογισμικό του εμπορίου κ.λπ.). Εάν η ανάλυση παλινδρόμησης αποτύχει (π.χ. όταν υπάρχουν λιγότερες από δύο μερικές αποκρίσεις), χρησιμοποιούνται άλλες, μη παραμετρικές μέθοδοι, όπως ο κινητός μέσος (όρος) ή η απλή παρεμβολή.

Ρυθμός ανάπτυξης

51. Ο μέσος χρόνος ανάπτυξης αντιπροσωπεύει το μέσο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εισαγωγή των προνυμφών (ημέρα 0 της δοκιμής) έως την εμφάνιση της πειραματικής κοόρτης χειρονόμων (για τον υπολογισμό του πραγματικού χρόνου ανάπτυξης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ηλικία των προνυμφών κατά τον χρόνο της εισαγωγής). Ο ρυθμός ανάπτυξης ισούται με το αντίστροφο του χρόνου ανάπτυξης (μονάδα: 1/ημέρα) και αντιπροσωπεύει το ημερήσιο τμήμα της ανάπτυξης των προνυμφών. Ο ρυθμός ανάπτυξης προτιμάται για την αξιολόγηση των παρουσών μελετών τοξικότητας σε ίζημα, καθώς παρουσιάζει μικρότερη διασπορά, είναι πιο ομοιογενής και προσεγγίζει περισσότερο την κανονική κατανομή σε σύγκριση με τον χρόνο ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, οι διαδικασίες ανθεκτικής παραμετρικής δοκιμασίας μπορούν να εφαρμόζονται στον ρυθμό ανάπτυξης αντί του χρόνου ανάπτυξης. Για τον ρυθμό ανάπτυξης ως συνεχή απόκριση, μπορούν να υπολογιστούν τιμές EC_x με ανάλυση παλινδρόμησης [π.χ. (23)(24)].

52. Για τις ακόλουθες στατιστικές δοκιμασίες, ο αριθμός των χειρονόμων που παρατηρήθηκε κατά την ημέρα επιθεώρησης x υποτίθεται ότι εμφανίστηκε κατά το μέσο χρονικό διάστημα μεταξύ της ημέρας x και της ημέρας x - 1 (l = διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης, συνήθως 1 ημέρα). Ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο (x) υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

όπου:

$\bar{x}$: μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο

i: δείκτης του διαστήματος επιθεώρησης

m: μέγιστος αριθμός διαστημάτων επιθεώρησης

▼M4

f_i: αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα επιθεώρησης i

n_e: συνολικός αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν στο τέλος του πειράματος ($=\sum f_i$)

x_i: ρυθμός ανάπτυξης των χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα i

$$x_i = 1/\left(\text{ημέρα}_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

όπου:

ημέρα_i: ημέρα επιθεώρησης (ημέρες από την εφαρμογή)

l_i: διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης i (ημέρες, συνήθως 1 ημέρα)

Έκθεση δοκιμής

53. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη ουσία:

— φυσική κατάσταση και, κατά περίπτωση, φυσικοχημικές ιδιότητες (υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, συντελεστής κατανομής στο έδαφος (ή στο ίζημα, εάν είναι διαθέσιμος), σταθερότητα στο νερό κ.λπ.),

— στοιχεία ταυτοποίησης χημικής ουσίας (κοινή ονομασία, χημική ονομασία, συντακτικός τύπος, αριθμός CAS κ.λπ.), συμπεριλαμβανομένων της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας.

Υπό δοκιμή είδος:

— ζώα που χρησιμοποιήθηκαν: είδος, επιστημονική ονομασία, πηγή των οργανισμών και συνθήκες αναπαραγωγής,

— πληροφορίες σχετικά με τη μεταχείριση των μαζών αυγών και των προνυμφών,

— ηλικία των ζώων κατά τον χρόνο εισαγωγής τους στα δοχεία δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

— ίζημα που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή φυσικό ή μορφοποιημένο,

— για τα φυσικά ιζήματα, τοποθεσία και περιγραφή του σημείου δειγματοληψίας του ιζήματος, συμπεριλαμβανομένου, εάν είναι δυνατόν, του ιστορικού μόλυνσης· χαρακτηριστικά: pH, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, αναλογία C/N και κοκκομετρία (κατά περίπτωση),

— παρασκευή του μορφοποιημένου ιζήματος: συστατικά και χαρακτηριστικά (περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, pH, υγρασία κ.λπ. κατά την έναρξη της δοκιμής),

— παρασκευή του νερού δοκιμής (εάν χρησιμοποιείται ανασυσταθέν νερό) και τα χαρακτηριστικά του (συγκέντρωση οξυγόνου, pH, αγωγιμότητα, σκληρότητα κ.λπ. κατά την έναρξη της δοκιμής),

— βάθος του ιζήματος και του υπερκείμενου νερού,

— όγκος του υπερκείμενου και του ενδοπορικού νερού· βάρος του υγρού ιζήματος με και χωρίς ενδοπορικό νερό,

— δοχεία δοκιμής (υλικό και μέγεθος),

— μέθοδος παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και συγκεντρώσεις δοκιμής·

▼M4

— εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας: συγκεντρώσεις δοκιμής που χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός επαναλήψεων και χρήση διαλύτη, εάν έγινε,

— συνθήκες επώασης: θερμοκρασία, φωτοπερίοδος και φωτεινή ισχύς, αερισμός (συχνότητα και ένταση),

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη διατροφή, συμπεριλαμβανομένων του είδους τροφής, της παρασκευής, της ποσότητας και του καθεστώτος σίτισης.

Αποτελέσματα:

— ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής και τα αποτελέσματα όλων των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στο δοχείο δοκιμής,

— ποιότητα του νερού στο εσωτερικό των δοχείων δοκιμής, δηλαδή pH, θερμοκρασία, διαλυμένο οξυγόνο, σκληρότητα και αμμωνία,

— αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού δοκιμής, εάν υπήρξε,

— αριθμός των αρσενικών και των θηλυκών χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο και ανά ημέρα,

— αριθμός των προνυμφών που δεν εμφανίστηκαν ως τέλειοι χειρονόμοι ανά δοχείο,

— μέσο ξηρό βάρος προνύμφης ανά δοχείο και ανά στάδιο, ανάλογα με την περίπτωση·

— ποσοστιαία εμφάνιση ανά επανάληψη και συγκέντρωση δοκιμής (συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους),

— μέσος ρυθμός ανάπτυξης των πλήρως αναπτυχθέντων χειρονόμων ανά επανάληψη και αγωγή (συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους),

— εκτιμήσεις των τοξικών καταληκτικών σημείων, π.χ. EC_x (και τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης), NOEC και/ή LOEC, και οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τους,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης τυχόν αποκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köpp, Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738, August 1994, WRc, UK.

(3) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002), Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241, στο ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology, Pesticides, ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius),* Technical Report. Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986), Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.* 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30ης September 1995.

(14) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

(15) Suedel B.C. και Rodgers J.H. (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.

(16) Naylor C. και Rodrigues C. (1995), Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment, *Chemosphere* 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *J. Amer. Statis. Assoc.* 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K. και Scott A.J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48:577-585.

(22) Christensen E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Research* 18: 213-221.

(23) Bruce και Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.

(24) Slob W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints, *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

▼**M4**

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Μορφοποιημένο ίζημα ή ανασυσταθέν, τεχνητό ή συνθετικό ίζημα είναι ένα μείγμα υλικών που χρησιμοποιείται για να απομιμείται τα φυσικά συστατικά ενός φυσικού ιζήματος.

Υπερκείμενο νερό είναι το νερό που τοποθετείται πάνω από το ίζημα στο δοχείο δοκιμής.

Διάμεσο νερό ή ενδοπορικό νερό είναι το νερό που καταλαμβάνει τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων του ιζήματος και του εδάφους.

Εμβολιασμένο νερό είναι το νερό δοκιμής στο οποίο έχει προστεθεί ελεγχόμενη ουσία.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

▼M4

Προσάρτημα 2

Συστάσεις για την καλλιέργεια του *Chironomus riparius*

1. Οι προνύμφες του γένους Chironomus μπορούν να εκτρέφονται σε δοχεία κρυστάλλωσης ή μεγαλύτερα δοχεία. Λεπτή χαλαζιακή άμμος απλώνεται σε ένα λεπτό στρώμα βάθους περίπου 5 έως 10 mm πάνω από τον πυθμένα του δοχείου. Το Kieselguhr (π.χ. Merck, Art 8117) έχει επίσης αποδειχθεί κατάλληλο υπόστρωμα (επαρκεί ένα λεπτότερο στρώμα πάχους πολύ λίγων mm). Στη συνέχεια, προστίθεται επαρκής ποσότητα νερού σε βάθος αρκετών εκατοστών. Το νερό θα πρέπει να συμπληρώνεται, όσο χρειάζεται ώστε να αναπληρώνονται οι απώλειες λόγω εξάτμισης, καθώς και για την πρόληψη της αποξήρανσης. Το νερό μπορεί να αντικαθίσταται, εάν είναι απαραίτητο. Θα πρέπει να παρέχεται ήπιος αερισμός. Τα δοχεία εκτροφής των προνυμφών θα πρέπει να είναι τοποθετημένα σε κατάλληλο κλωβό που να αποτρέπει τη διαφυγή των εμφανιζόμενων ενηλίκων εντόμων. Ο κλωβός πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος για να επιτρέπει στα εμφανιζόμενα ενήλικα έντομα να σχηματίσουν σμήνος, γιατί διαφορετικά δεν είναι δυνατή η αναπαραγωγή (οι ελάχιστες διαστάσεις είναι περίπου 30 × 30 × 30 cm).

2. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου ή σε αίθουσα σταθερού περιβάλλοντος, στους 20 + 2 °C, με φωτοπερίοδο 16 ωρών (ισχύς περίπου 1 000 lux). Έχει αναφερθεί ότι υγρασία του αέρα μικρότερη από 60 % RH μπορεί να εμποδίσει την αναπαραγωγή.

Νερό αραίωσης

3. Μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοδήποτε κατάλληλο φυσικό ή συνθετικό νερό. Συνήθως χρησιμοποιούνται νερό γεώτρησης, αποχλωριωμένο νερό βρύσης και τεχνητά μέσα (π.χ. θρεπτικό υλικό Elendt «M4» ή «M7», βλέπε κατωτέρω). Το νερό πρέπει να αερίζεται πριν από τη χρήση. Εάν είναι απαραίτητο, το νερό καλλιέργειας μπορεί να ανανεώνεται με έκχυση ή σιφωνισμό του χρησιμοποιημένου νερού από τα δοχεία καλλιέργειας, με προσοχή, χωρίς να καταστρέφονται οι σωλήνες των προνυμφών.

Σίτιση προνυμφών

4. Οι προνύμφες του γένους Chironomus πρέπει να τρέφονται με νιφάδες τροφής για ψάρια (TetraMin, TetraPhyll ή άλλη παρόμοια τροφή για ψάρια με κατοχυρωμένο εμπορικό σήμα), σε ποσότητα περίπου 250 mg ανά δοχείο ανά ημέρα. Η τροφή αυτή μπορεί να χορηγείται ως ξηρή αλεσμένη σκόνη ή ως εναιώρημα σε νερό: 1,0 g νιφάδων τροφής προστίθεται σε 20 ml νερού αραίωσης και αναμειγνύεται για να προκύψει ένα ομοιογενές μείγμα. Το παρασκεύασμα αυτό μπορεί να χορηγείται με ρυθμό περίπου 5 ml ανά δοχείο ημερησίως (ανακινείται πριν από τη χρήση). Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορούν να λαμβάνουν μεγαλύτερες ποσότητες.

5. Η σίτιση ρυθμίζεται ανάλογα με την ποιότητα του νερού. Εάν το μέσο καλλιέργειας «θολώσει», η σίτιση θα πρέπει να μειωθεί. Οι προσθήκες τροφής θα πρέπει να παρακολουθούνται επισταμένως. Η υπερβολικά μικρή ποσότητα τροφής θα προκαλέσει μετανάστευση των προνυμφών προς τη στήλη ύδατος, ενώ η υπερβολικά μεγάλη ποσότητα θα προκαλέσει αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα και μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου. Οι συνθήκες αυτές μπορούν να οδηγήσουν και οι δύο σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης.

6. Μπορούν επίσης να προστίθενται κύτταρα ορισμένων πράσινων φυκών (π.χ. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), όταν ετοιμάζονται νέα δοχεία καλλιέργειας.

Σίτιση εμφανιζόμενων ενηλίκων

7. Ορισμένοι πειραματιστές έχουν προτείνει τον εμποτισμό ενός τεμαχίου βαμβακιού με κορεσμένο διάλυμα σακχαρόζης για να χρησιμεύσει ως τροφή για τα εμφανιζόμενα ενήλικα έντομα.

▼M4

Εμφάνιση

8. Στους 20 ± 2 °C θα αρχίσουν να εμφανίζονται ενήλικα έντομα από τα δοχεία εκτροφής προνυμφών μετά από περίπου 13-15 ημέρες. Τα αρσενικά διακρίνονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους.

Μάζες αυγών

9. Μόλις εμφανιστούν ενήλικα έντομα μέσα στον κλωβό αναπαραγωγής, όλα τα δοχεία εκτροφής προνυμφών θα πρέπει να ελέγχονται τρεις φορές την εβδομάδα για απόθεση των ζελατινωδών μαζών αυγών. Εάν υπάρχουν μάζες αυγών, πρέπει να αφαιρούνται με προσοχή και να μεταφέρονται σε έναν μικρό δίσκο που περιέχει δείγμα του νερού αναπαραγωγής. Οι μάζες των αυγών χρησιμοποιούνται για την έναρξη καλλιέργειας σε νέο δοχείο (π.χ. 2-4 μάζες αυγών/δοχείο) ή για δοκιμές τοξικότητας.

10. Οι προνύμφες πρώτου σταδίου πρέπει να εκκολάπτονται μετά από 2-3 ημέρες.

Ετοιμασία νέων δοχείων καλλιέργειας

11. Από τη στιγμή που οι καλλιέργειες έχουν εγκατασταθεί, υπάρχει δυνατότητα ετοιμασίας νέων δοχείων καλλιέργειας προνυμφών ανά εβδομάδα ή λιγότερο συχνά, ανάλογα με τις απαιτήσεις της δοκιμής, με αφαίρεση των παλαιότερων δοχείων μετά την εμφάνιση των ενήλικων χειρονόμων. Με τη χρήση του συστήματος αυτού, θα παράγεται κανονική ποσότητα ενηλίκων εντόμων με την ελάχιστη δυνατή διαχείριση.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής «M4» και «M7»

12. Το θρεπτικό υλικό «M4» έχει περιγραφεί από τον Elendt (1990). Το υλικό «M7» παρασκευάζεται όπως και το «M4», εκτός από τις ουσίες που αναφέρονται στον πίνακα 1, των οποίων οι συγκεντρώσεις στο «M7» είναι υποτετραπλάσιες εκείνων του «M4». Συντάσσεται επί του παρόντος δημοσίευση για το θρεπτικό υλικό «M7» (Elendt, προσωπική επικοινωνία). Το διάλυμα δοκιμής δεν πρέπει να παρασκευάζεται σύμφωνα με τους Elendt και Bias (1990), επειδή οι συγκεντρώσεις $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 και K_2HPO_4 που υποδεικνύονται για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης δεν είναι επαρκείς.

Παρασκευή του θρεπτικού υλικού «M7»

13. Κάθε διάλυμα παρακαταθήκης (I) παρασκευάζεται χωριστά και από τα εν λόγω διαλύματα (I) παρασκευάζεται συνδυασμένο διάλυμα παρακαταθήκης (II) (βλέπε πίνακα 1). Πενήντα ml από το συνδυασμένο διάλυμα παρακαταθήκης (II) αναμειγνύονται με τις ποσότητες κάθε διαλύματος παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών που εμφαίνονται στον πίνακα 2 και ο όγκος συμπληρώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού «M7». Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών με την προσθήκη τριών βιταμινών σε απιονισμένο νερό, όπως υποδεικνύεται στον πίνακα 3, και 0,1 ml από το διάλυμα παρακαταθήκης συνδυασμού βιταμινών προστίθενται στο τελικό θρεπτικό υλικό «M7» λίγο πριν από τη χρήση (το διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών αποθηκεύεται κατεψυγμένο σε μικρά κλάσματα). Το θρεπτικό υλικό αερίζεται και σταθεροποιείται.

Πίνακας 1

Διαλύματα παρακαταθήκης ιχνοστοιχείων για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

Διάλυμα παρακαταθήκης (I)	Ποσότητα (mg) που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό	Για την παρασκευή του συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II): αναμειγνύονται οι ακόλουθες ποσότητες (ml) διαλυμάτων παρακαταθήκης (I) και συμπληρώνεται ο όγκος έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό		Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Διάλυμα παρακαταθήκης (I)	Ποσότητα (mg) που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό	Για την παρασκευή του συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II): αναμειγνύονται οι ακόλουθες ποσότητες (ml) διαλυμάτων παρακαταθήκης (I) και συμπληρώνεται ο όγκος έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό		Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Οι ουσίες αυτές διαφέρουν μεταξύ του M4 και του M7, όπως αναφέρεται ανωτέρω.
(2) Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται χωριστά, ενώνονται και αποστειρώνονται αμέσως σε αυτόκαυστο.

Πίνακας 2

Διαλύματα παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

	Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg)	Ποσότητα μητρικών διαλυμάτων μακροθρεπτικών συστατικών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l)	Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Πίνακας 3

Διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

Συνδυάζονται και τα τρία διαλύματα βιταμινών για την παρασκευή ενιαίου διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών.

	Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg)	Ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l)	Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l)
Υδροχλωρική θειαμίνη	750	0,1	0,075
Κυανοκοβαλαμίνη (B12)	10	0,1	0,0010
Βιοτίνη	7,5	0,1	0,00075

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

BBA (1995), Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H.Köpp, Berlin 1995.

Elendt B.P. (1990), Selenium Deficiency in Crustacean, *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. και Bias W.-R. (1990), Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*, *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Προσάρτημα 3

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

Σύνθεση του ιζήματος

Η σύνθεση του μορφοποιημένου ιζήματος θα πρέπει να έχει ως εξής:

Συστατικά	Χαρακτηριστικά	% επί του ξηρού βάρους του ιζήματος
Τύρφη	Τύρφη σφάγνων, με pH όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο 5,5 - 6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 1 mm) και αερόξηρη	4 - 5
Χαλαζιακή άμμος	Μέγεθος κόκκων: > 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να έχει μέγεθος 50-200 μm	75 - 76
Καολινιτική άργιλος	Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 %	20
Οργανικός άνθρακας	Ρυθμίζεται με προσθήκη τύρφης και άμμου	2 (± 0,5)
Ανθρακικό ασβέστιο	$CaCO_3$, κονιοποιημένο, χημικά καθαρό	0,05 - 0,1
Νερό	Αγωγιμότητα ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Προετοιμασία

Η τύρφη ξηραίνεται στον αέρα και αλέθεται σε λεπτή σκόνη. Παρασκευάζεται εναιώρημα της απαιτούμενης ποσότητας σκόνης τύρφης σε απιονισμένο νερό με τη βοήθεια ομοιογενοποιητή υψηλής απόδοσης. Το pH του εν λόγω εναιωρήματος ρυθμίζεται στο 5,5± 0,5 με $CaCO_3$. Το εναιώρημα εγκλιματίζεται τουλάχιστον για δύο ημέρες με ήπια ανάδευση στους 20 ± 2 °C, για τη σταθεροποίηση του pH και τη δημιουργία σταθερού μικροβιακού συστατικού. Το pH μετράται εκ νέου και θα πρέπει να είναι 6,0 ± 0,5. Στη συνέχεια, το εναιώρημα τύρφης αναμειγνύεται με τα άλλα συστατικά (άμμος και καολινιτική άργιλος) και με απιονισμένο νερό για να ληφθεί ένα ομοιογενές ίζημα με περιεκτικότητα σε νερό 30-50 % επί του ξηρού βάρους του ιζήματος. Το pH του τελικού μείγματος μετράται και πάλι και ρυθμίζεται σε 6,5 έως 7,5 με $CaCO_3$, εάν είναι απαραίτητο. Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα. Στη συνέχεια, πριν από τη χρήση του ιζήματος στη δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες, συνιστάται ο εγκλιματισμός του μορφοποιημένου ιζήματος για επτά ημέρες υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή.

Αποθήκευση

Τα ξηρά συστατικά για την παρασκευή του τεχνητού ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται σε ξηρό και δροσερό χώρο, σε θερμοκρασία δωματίου. Το μορφοποιημένο (υγρό) ίζημα δεν πρέπει να αποθηκεύεται πριν από τη χρήση του στη δοκιμή. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την πάροδο των 7 ημερών εγκλιματισμού με τον οποίο ολοκληρώνεται η παρασκευή του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media, *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

▼**M4**

Προσάρτημα 4

Χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραίωσης

Ουσία	Συγκεντρώσεις
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 μg/l
Σκληρότητα ως $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 μg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	< 25 ng/l

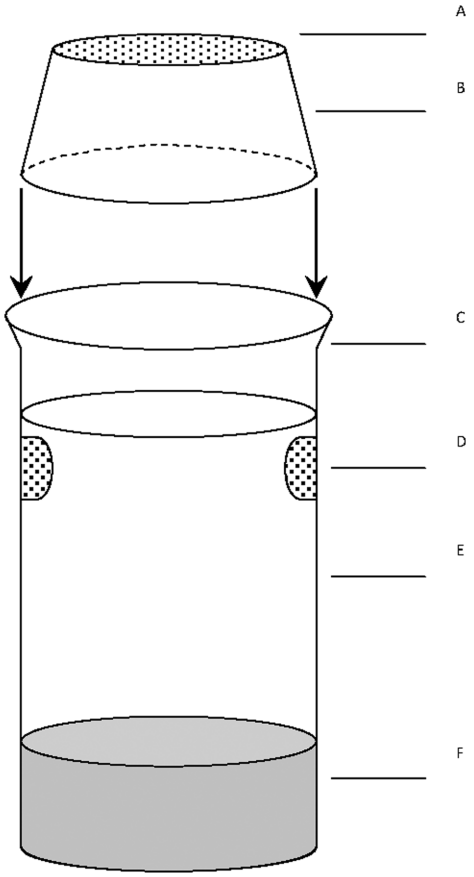
(*) Ωστόσο, σημειώνεται ότι εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της ελεγχόμενης ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και, ως εκ τούτου, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elendt M4 σε αυτή την περίπτωση).

▼**M4**

Προσάρτημα 5

Κατευθύνσεις για την παρακολούθηση της εξόδου των προνυμφών χειρονομίδων

Τοποθετούνται παγίδες εξόδου στα ποτήρια ζέσεως της δοκιμής. Οι παγίδες αυτές χρειάζονται από την 20ή ημέρα έως το τέλος της δοκιμής. Ένα παράδειγμα χρησιμοποιούμενης παγίδας αναπαρίσταται κατωτέρω:



A: νάιλον σίτα

B: ανεστραμμένα πλαστικά ποτήρια

C: ποτήρι έκθεσης χωρίς χείλος

D: έξοδοι σίτας για την ανταλλαγή υδάτων

E: νερό

F: ίζημα

▼M4

Γ.29. ΑΜΕΣΗ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ — CO_2 ΣΕ ΣΦΡΑΓΙΣΜΕΝΑ ΔΟΧΕΙΑ (ΔΟΚΙΜΉ ΥΠΕΡΚΕΊΜΕΝΗΣ ΦΆΣΗΣ)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 310 (2006) του ΟΟΣΑ. Πρόκειται για μια μέθοδο διαλογής για την αξιολόγηση της άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας των χημικών ουσιών και παρέχει παρόμοιες πληροφορίες με τις έξι μεθόδους δοκιμών, Α έως Ζ, που περιγράφονται στο κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος. Ως εκ τούτου, μια χημική ουσία που επιδεικνύει θετικά αποτελέσματα στην παρούσα μέθοδο δοκιμών μπορεί να θεωρηθεί άμεσα βιοαποικοδομήσιμη και, κατά συνέπεια, ταχέως αποικοδομήσιμη στο περιβάλλον.

2. Η καθιερωμένη μέθοδος του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) (1), με βάση την αρχική δοκιμή Sturm (2) για την αξιολόγηση της βιοαποικοδομησιμότητας των οργανικών χημικών ουσιών, με τη μέτρηση του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται από μικροβιακή δράση, αποτελεί κατά κανόνα την πρώτη επιλογή για τη δοκιμή δυσδιάλυτων χημικών ουσιών και αυτών που παρουσιάζουν ισχυρή προσρόφηση. Επιλέγεται, επίσης, για διαλυτές (αλλά όχι πτητικές) χημικές ουσίες, δεδομένου ότι η έκλυση διοξειδίου του άνθρακα θεωρείται από πολλούς ως η μόνη κατηγορηματική απόδειξη μικροβιακής δραστηριότητας. Η απομάκρυνση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα μπορεί να επιτευχθεί με φυσικοχημικές διεργασίες – προσρόφηση, εξάτμιση, καθίζηση, υδρόλυση – καθώς και με μικροβιακή δράση, ενώ και πολλές μη βιολογικές αντιδράσεις καταναλώνουν οξυγόνο. Σπάνια παράγεται CO_2 αβιοτικά από οργανικές χημικές ουσίες. Στην αρχική και τροποποιημένη δοκιμή Sturm (1)(2) το CO_2 απομακρύνεται από την υγρή φάση και διοχετεύεται σε απορροφητικά δοχεία με ψεκασμό (δηλαδή διαβίβαση φυσαλίδων αέρα μέσω του υγρού μέσου για την απομάκρυνση του CO_2), ενώ στην εκδοχή του Larson (3)(4) το CO_2 μεταφέρεται από το δοχείο αντίδρασης στους απορροφητές με τη διαβίβαση αέρα απαλλαγμένου από CO_2 μέσω του υπερκείμενου χώρου και, επιπροσθέτως, με συνεχή ανακίνηση του δοχείου δοκιμής. Η ανακίνηση του δοχείου αντίδρασης προβλέπεται μόνο στην τροποποίηση του Larson. Η ανάδευση αναφέρεται μόνον για τις αδιάλυτες ουσίες στο πρότυπο ISO 9439 (5) και στην αρχική έκδοση των ΗΠΑ (6), οι οποίες αναφέρουν ψεκασμό και όχι αντικατάσταση της υπερκείμενης φάσης. Σε μία άλλη επίσημη μέθοδο της Υπηρεσίας Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (EPA) (7), η οποία βασίζεται στη μέθοδο Gledhill (8), το ανακινούμενο δοχείο αντίδρασης δεν έρχεται σε επαφή με την ατμόσφαιρα και το παραγόμενο CO_2 συλλέγεται σε μια εσωτερική αλκαλική παγίδα απευθείας από την αέρια φάση, όπως στις κλασικές αναπνευσιομετρικές φιάλες Warburg/Barcroft.

3. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι ο ανόργανος άνθρακας (IC) συσσωρεύεται στο μέσο κατά την εφαρμογή της τυποποιημένης, τροποποιημένης δοκιμής Sturm σε μια σειρά από χημικές ουσίες (9). Συγκέντρωση IC έως 8 mg/l διαπιστώθηκε κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης ανιλίνης 20 mg C/l. Επομένως, η συλλογή του CO_2 στις αλκαλικές παγίδες δεν δίνει μια πιστή εικόνα της ποσότητας του CO_2 που παράγεται μικροβιολογικά σε ενδιάμεσους χρόνους κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης. Κατά συνέπεια, η προδιαγραφή σύμφωνα με την οποία > 60 % της θεωρητικά μέγιστης παραγωγής CO_2 ($ThCO_2$) πρέπει να συλλέγεται εντός «10ήμερου χρονικού διαστήματος» (οι 10 ημέρες αμέσως μετά από την επίτευξη βιοαποικοδόμησης σε ποσοστό 10 %) προκειμένου μια ελεγχόμενη χημική ουσία να ταξινομείται ως άμεσα βιοαποικοδομημένη δεν θα πληρούται για ορισμένες χημικές ουσίες οι οποίες θα μπορούσαν να καταταχθούν στην κατηγορία αυτή μέσω της απομάκρυνσης του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC).

4. Όταν η ποσοστιαία αποικοδόμηση λαμβάνει κατώτερη τιμή από την αναμενόμενη, είναι πιθανό ότι ο IC έχει συσσωρευθεί στο διάλυμα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, η αποικοδομησιμότητα μπορεί να εκτιμηθεί με τις υπόλοιπες δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας.

▼M4

5. Τα λοιπά μειονεκτήματα της μεθοδολογίας Sturm (περίπλοκη, χρονοβόρα, πιο επιρρεπής σε πειραματικά σφάλματα και μη εφαρμοστέα σε πτητικές χημικές ουσίες), είχαν υποκινήσει νωρίτερα την έρευνα με αντικείμενο μια τεχνική με σφραγισμένο δοχείο, διαφορετική από αυτήν του Gledhill, αντί του συστήματος συνεχούς ροής αερίου (10)(11). Οι Boatman et al. (12) επανεξέτασαν τις προηγούμενες μεθόδους και υιοθέτησαν ένα κλειστό σύστημα υπερκείμενης φάσης, στο οποίο το CO_2 ελευθερωνόταν εντός του υπερκείμενου χώρου στο τέλος της επώασης με οξίνιση του μέσου. Το CO_2 μετρούνταν με ανάλυση αεριοχρωματογραφίας (GC)/IC σε αυτομάτως λαμβανόμενα δείγματα της υπερκείμενης φάσης, αλλά δεν συνυπολογιζόταν ο διαλυμένος ανόργανος άνθρακας (DIC) στην υγρή φάση. Επίσης, τα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολύ μικρά (20 ml) και περιείχαν μόνο 10 ml του μέσου, πράγμα που προκαλούσε προβλήματα π.χ. κατά την προσθήκη των αναγκαστικά πολύ μικρών ποσοτήτων αδιάλυτων ελεγχόμενων χημικών ουσιών και/ή ανεπαρκή ή μηδενική παρουσία μικροοργανισμών στο εμβολιασμένο μέσο, ικανών να αποικοδομήσουν τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες.

6. Οι δυσκολίες αυτές έχουν υπερνικηθεί χάρη στις ανεξάρτητες μελέτες των Struijs και Stoltenkamp (13) και των Birch και Fletcher (14), με τους δεύτερους να εμπνέονται από την εμπειρία τους με συσκευές που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή αναερόβιας βιοαποικοδόμησης (15). Στην πρώτη μέθοδο (13), το CO_2 μετράται στον υπερκείμενο χώρο μετά από οξίνιση και ισορρόπηση, ενώ στη δεύτερη (14) ο DIC μετράται τόσο στην αέρια όσο και στην υγρή φάση, χωρίς κατεργασία. Πάνω από το 90 % του IC που σχηματίστηκε ήταν παρόν στην υγρή φάση. Αμφότερες οι μέθοδοι είχαν πλεονεκτήματα έναντι της δοκιμής Sturm από την άποψη ότι το σύστημα δοκιμής είναι πιο συμπαγές και εύχρηστο, μπορούν να υποβληθούν σε δοκιμή πτητικές χημικές ουσίες και αποφεύγεται η πιθανή καθυστέρηση στη μέτρηση του παραγόμενου CO_2.

7. Οι δύο προσεγγίσεις συνδυάστηκαν στο πρότυπο υπερκείμενης φάσης CO_2 του ISO (16), το οποίο υποβλήθηκε σε κυκλική δοκιμή (17) και πρόκειται για το πρότυπο που αποτελεί τη βάση της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Ομοίως, οι δύο προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο της Υπηρεσίας Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (EPA) (18). Έχουν διατυπωθεί συστάσεις για δύο μεθόδους μέτρησης του CO_2, συγκεκριμένα του CO_2 στον υπερκείμενο χώρο μετά από την οξίνιση (13) και του IC στην υγρή φάση, μετά από την προσθήκη περίσσειας αλκαλίου. Η δεύτερη μέθοδος εισήχθη από τον Peterson κατά τη διάρκεια της κυκλικής δοκιμής CONCAWE (19) της παρούσας μεθόδου υπερκείμενης φάσης, η οποία τροποποιήθηκε για τη μέτρηση της εγγενούς βιοαποικοδομησιμότητας. Οι αλλαγές που επήλθαν με την αναθεώρηση, το 1992 (20), των μεθόδων του κεφαλαίου Γ.4 του παρόντος παραρτήματος για την άμεση βιοαποικοδομησιμότητα έχουν ενσωματωθεί στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, ώστε οι συνθήκες (μέσο, διάρκεια κ.λπ.), να είναι κατά τα άλλα ίδιες με εκείνες της αναθεωρημένης δοκιμή Sturm (20). Οι Birch και Fletcher (14) έχουν δείξει ότι με την παρούσα δοκιμή υπερκείμενης φάσης ελήφθησαν αποτελέσματα πολύ παρόμοια με εκείνα που προέκυψαν με τις ίδιες χημικές ουσίες στην κυκλική δοκιμή του ΟΟΣΑ (21) για τις αναθεωρημένες μεθόδους δοκιμών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Η ελεγχόμενη χημική ουσία, κατά κανόνα σε συγκέντρωση 20 mg C/l, ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, επωάζεται σε ένα μέσο με ρυθμιστικό διάλυμα και ανόργανα άλατα, το οποίο έχει εμβολιαστεί με έναν μεικτό πληθυσμό μικροοργανισμών. Η δοκιμή διεξάγεται σε σφραγισμένες φιάλες με υπερκείμενο χώρο αέρα, ο οποίος παρέχει απόθεμα οξυγόνου για την αερόβια βιοαποικοδόμηση. Η έκλυση CO_2 που προκύπτει από την τελική αερόβια βιοαποικοδόμηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας προσδιορίζεται με μέτρηση της περίσσειας IC που παράγεται στις φιάλες δοκιμής σε σχέση με εκείνον που παράγεται σε τυφλά δοχεία που περιέχουν μόνον εμβολιασμένο μέσο. Η έκταση της βιοαποικοδόμησης εκφράζεται ως ποσοστό της θεωρητικής μέγιστης παραγωγής IC (ThIC), με βάση την ποσότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (ως οργανικού άνθρακα) που έχει αρχικά προστεθεί.

9. Μπορούν επίσης να μετρηθούν η απομάκρυνση DOC και/ή η έκταση της πρωτοβάθμιας βιοαποικοδόμησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (20).

▼M4

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

10. Η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (% w/w) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας πρέπει να είναι γνωστή, είτε από τη χημική δομή της είτε με μέτρηση, ούτως ώστε να μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό αποικοδόμησης. Για τις πτητικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες, μια μετρημένη ή υπολογισμένη σταθερά του νόμου του Henry είναι χρήσιμη για τον καθορισμό της κατάλληλης αναλογίας των όγκων του υπερκείμενου χώρου και του υγρού. Οι πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα των ελεγχόμενων χημικών ουσιών στους μικροοργανισμούς είναι χρήσιμες για την επιλογή μιας κατάλληλης συγκέντρωσης δοκιμής, καθώς και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που παρουσιάζουν ανεπαρκή βιοαποικοδομησιμότητα: συνιστάται να περιλαμβάνεται ο μάρτυρας αναστολής εκτός εάν είναι γνωστό ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν είναι ανασταλτική στη μικροβιακή δραστηριότητα (βλέπε παράγραφο 24).

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

11. Η δοκιμή εφαρμόζεται σε υδατοδιαλυτές και αδιάλυτες ελεγχόμενες χημικές ουσίες, ενώ θα πρέπει να διασφαλίζεται η καλή διασπορά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Χρησιμοποιώντας τη συνιστώμενη αναλογία όγκων υπερκείμενου χώρου και υγρού 1:2, οι πτητικές χημικές ουσίες με σταθερά του νόμου του Henry έως 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ μπορεί να υποβληθούν σε δοκιμή, καθώς το ποσοστό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον υπερκείμενο χώρο δεν θα υπερβαίνει το 1 % (13). Μικρότερος όγκος υπερκείμενου χώρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη δοκιμή χημικών ουσιών, οι οποίες είναι πιο ασταθείς, των οποίων όμως η βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να είναι περιοριστική ειδικά εάν είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό. Ωστόσο, οι χρήστες πρέπει να εξασφαλίζουν ότι η αναλογία όγκων υπερκείμενου χώρου και νερού και η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι τέτοιες ώστε να είναι διαθέσιμο επαρκές οξυγόνο που να επιτρέπει την πλήρη αερόβια βιοαποικοδόμηση (π.χ. αποφυγή χρήσης υψηλής συγκέντρωσης υποστρώματος και μικρού όγκου υπερκείμενου χώρου). Καθοδήγηση σχετικά με το θέμα αυτό παρέχουν οι παραπομπές (13)(23).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

12. Προκειμένου να ελεγχθεί η διαδικασία δοκιμής, θα πρέπει να εξετάζεται παράλληλα μια χημική ουσία αναφοράς γνωστής βιοαποικοδομησιμότητας. Για τον σκοπό αυτό, μπορούν να χρησιμοποιούνται ανιλίνη, βενζοϊκό νάτριο ή αιθυλενογλυκόλη κατά τη δοκιμή υδατοδιαλυτών ελεγχόμενων χημικών ουσιών και 1-οκτανόλη για δυσδιάλυτες ελεγχόμενες χημικές ουσίες (13). Το ποσοστό βιοαποικοδόμησης των χημικών αυτών ουσιών πρέπει να φθάνει σε επίπεδα > 60 % ThIC εντός 14 ημερών.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

13. Στην κυκλική δοκιμή ISO της μεθόδου (17), ελήφθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα υπό τις συνιστώμενες συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των 20 mg C ελεγχόμενης χημικής ουσίας/l.

Ελεγχόμενη χημική ουσία	Μέσο ποσοστό βιοαποικοδόμησης (28 ημέρες)	Συντελεστής μεταβλητότητας (%)	Αριθμός εργαστηρίων
Ανιλίνη	90	16	17
1-Οκτανόλη	85	12	14

Η μεταβλητότητα εντός της δοκιμής (επαναληψιμότητα), με τη χρήση ανιλίνης, ήταν χαμηλή, με συντελεστές μεταβλητότητας όχι μεγαλύτερους από 5 % σε όλες σχεδόν τις μετρήσεις των δοκιμών. Στις δύο περιπτώσεις κατά τις οποίες η επαναληψιμότητα ήταν χειρότερη, η μεγαλύτερη μεταβλητότητα οφειλόταν κατά πάσα πιθανότητα στη μεγάλη παραγωγή IC στα τυφλά. Η επαναληψιμότητα ήταν χειρότερη με την 1-οκτανόλη, αλλά εξακολουθούσε να είναι μικρότερη από 10 % στο 79 % των μετρήσεων της δοκιμής. Η εν λόγω μεγαλύτερη μεταβλητότητα εντός της δοκιμής μπορεί να οφείλεται σε σφάλματα δοσολογίας, καθώς ένας μικρός όγκος (3 έως 4 μl) 1-οκτανόλης έπρεπε να εγχέεται σε σφραγισμένες φιάλες δοκιμής. Υψηλότεροι συντελεστές μεταβλητότητας προκύπτουν όταν χρησιμοποιούνται χαμηλότερες συγκεντρώσεις των ελεγχόμενων χημικών ουσιών, ειδικά σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 10 mg C/l. Αυτό θα μπορούσε εν μέρει να αντιμετωπιστεί με τη μείωση της συγκέντρωσης του ολικού ανόργανου άνθρακα (TIC) στο εμβόλιο.

▼M4

14. Σε μια κυκλική δοκιμή της ΕΕ (24) με την προσθήκη πέντε επιφανειοδραστικών ουσιών σε συγκέντρωση 10 mg C/l, ελήφθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Ελεγχόμενη χημική ουσία	Μέσο ποσοστό βιοαποικοδόμησης (28 ημέρες)	Συντελεστής μεταβλητότητας (%)	Αριθμός εργαστηρίων
Βενζολοσουλφονικό τετραπροπυλένιο	17	45	10
Σουλφοηλεκτρικό δι-σοοκτύλιο (ανιονικό)	72	22	9
Χλωριούχο δεκαεξυλο-τριμεθυλαμμώνιο (*) (κατιονικό)	75	13	10
Ισο-εννεϋλοφαινόλη (αιθοξυλιωμένη)$_9$ (μη ιονικό)	41	32	10
Αμιδο-κοκο-προπυλο-διμεθυλυδροξυ-σουλφοβεταΐνη (επαμφοτερίζον)	60	23	11

(*) Προστέθηκε SiO_2 για να εξουδετερώσει την τοξικότητα.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, γενικά, η μεταβλητότητα ήταν υψηλότερη για τις επιφανειοδραστικές ουσίες με τη λιγότερο ικανοποιητική βιοαποικοδόμηση. Η μεταβλητότητα εντός της δοκιμής ήταν μικρότερη από 15 % σε πάνω από το 90 % των περιπτώσεων, ενώ η υψηλότερη ανήλθε σε 30-40 %.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Οι περισσότερες επιφανειοδραστικές ουσίες δεν είναι ενιαία μόρια, αλλά μείγματα ισομερών, ομολόγων κ.λπ., τα οποία αποικοδομούνται μετά από διάφορες χαρακτηριστικές λανθάνουσες περιόδους και σε διαφορετικές ταχύτητες κινητικής, με αποτέλεσμα «θολές», αμβλείες καμπύλες, ούτως ώστε η τιμή επιτυχίας του 60 % να μην μπορεί να επιτευχθεί εντός του «10ημέρου χρονικού διαστήματος», παρόλο που κάθε επιμέρους μόριο θα έφθανε σε επίπεδα > 60 % εντός 10 ημερών εάν υποβαλλόταν μεμονωμένα σε δοκιμή. Τούτο μπορεί να παρατηρηθεί και με άλλα σύνθετα μείγματα.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εξοπλισμός

15. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, καθώς και:

α) γυάλινες φιάλες ορού, σφραγισμένες με πώματα από ελαστικό βουτυλίου και επιπώματα από αλουμίνιο. Το προτεινόμενο μέγεθος είναι «125 ml», με συνολικό όγκο περίπου 160 ml (στην περίπτωση αυτή, ο όγκος κάθε φιάλης θα πρέπει να είναι γνωστός ως 160 ± 1 ml). Μπορούν να χρησιμοποιούνται δοχεία μικρότερου μεγέθους, όταν τα αποτελέσματα πληρούν τις προϋποθέσεις των παραγράφων 66 και 67·

β) αναλυτής άνθρακα ή άλλο όργανο (π.χ. αεριοχρωματογράφος) για τη μέτρηση του ανόργανου άνθρακα·

▼M4

γ) σύριγγες μεγάλης ακρίβειας για αέρια και υγρά δείγματα·

δ) τάρακτρο σε περιβάλλον ελεγχόμενης θερμοκρασίας·

ε) παροχή αέρα απαλλαγμένου από CO_2 — μπορεί να επιτευχθεί με τη διοχέτευση αέρα μέσω κόκκων καυστικής σόδας ή με τη χρήση μείγματος αερίων 80 % N_2 / 20 % O_2 (προαιρετικά) (βλέπε παράγραφο 28)·

στ) συσκευή διήθησης με μεμβράνη πορώδους 0,20-0,45 μm (προαιρετικά)·

ζ) αναλυτής οργανικού άνθρακα (προαιρετικά).

Αντιδραστήρια

16. Χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας σε όλη τη δοκιμή.

Νερό

17. Πρέπει να χρησιμοποιείται απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό που περιέχει ≤ 1 mg/l ως ολικό οργανικό άνθρακα. Αυτό αντιπροσωπεύει ≤ 5 % της αρχικής περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα που εισάγεται από τη συνιστώμενη δόση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

Διαλύματα παρακαταθήκης για το μέσο ανόργανων αλάτων

18. Τα διαλύματα παρακαταθήκης και το μέσο ανόργανων αλάτων είναι παρόμοια με τα προβλεπόμενα στο πρότυπο ISO 14593 (16) και στις δοκιμές του κεφαλαίου Γ.4 «Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα» (20). Η χρήση υψηλότερης συγκέντρωσης χλωριούχου αμμωνίου (2,0 g/l αντί για 0,5 g/l) θα πρέπει να είναι απαραίτητη μόνο σε πολύ εξαιρετικές περιπτώσεις, π.χ. όταν η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι > 40 mg C/l. Τα διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει να φυλάσσονται υπό ψύξη και να απορρίπτονται μετά από έξι μήνες, ή και νωρίτερα, εάν υπάρχουν ενδείξεις καθίζησης ή ανάπτυξης μικροβίων. Παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα παρακαταθήκης:

α) Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) 8,50 g

Όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4) 21,75 g

Διένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) 0,50 g

Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1 λίτρο. Το pH του διαλύματος θα πρέπει να είναι 7,4 (± 0,2). Σε αντίθετη περίπτωση, παρασκευάζεται νέο διάλυμα.

β) Διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1 λίτρο.

γ) Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1 λίτρο.

δ) Εξαένυδρος χλωριούχος σίδηρος (III) ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Διάλυση σε νερό, συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1 λίτρο και προσθήκη μιας σταγόνας πυκνού HCl.

Παρασκευή του ανόργανου μέσου

19. Αναμειγνύονται 10 ml διαλύματος α) με περίπου 800 ml νερού (παράγραφος 17), στη συνέχεια προστίθεται 1 ml των διαλυμάτων β), γ) και δ) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο με νερό (παράγραφος 17).

Άλλα αντιδραστήρια

20. Πυκνό ορθοφωσφορικό οξύ (H_3PO_4) (> 85 % κατά μάζα προς όγκο).

▼M4

Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 7M

21. Διαλύονται 280 g υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) σε 1 λίτρο νερού (παράγραφος 17). Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του DIC του εν λόγω διαλύματος και η τιμή της λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό του αποτελέσματος της δοκιμής (βλέπε παραγράφους 55 και 61), ιδίως υπό το πρίσμα του κριτηρίου εγκυρότητας της παραγράφου 66 (β). Παρασκευάζεται νέο διάλυμα σε περίπτωση που η συγκέντρωση του DIC είναι πολύ υψηλή.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

22. Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης μιας επαρκώς υδατοδιαλυτής ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε νερό (παράγραφος 17) ή στο μέσο δοκιμής (παράγραφος 19), με συγκέντρωση κατά προτίμηση 100πλάσια της τελικής συγκέντρωσης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή. Ενδέχεται να χρειαστεί ρύθμιση του pH του διαλύματος παρακαταθήκης. Το διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει να προστίθεται στο ανόργανο μέσο για να προκύψει τελική συγκέντρωση οργανικού άνθρακα μεταξύ 2 και 40 mg C/l, κατά προτίμηση 20 mg C/l. Εάν χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτές, η ακρίβεια που προκύπτει μπορεί να έχει απομειωθεί. Οι διαλυτές και αδιάλυτες υγρές χημικές ουσίες μπορούν να προστίθενται απευθείας στα δοχεία με σύριγγες μεγάλης ακρίβειας. Οι δυσδιάλυτες και αδιάλυτες ελεγχόμενες χημικές ουσίες μπορεί να απαιτούν ειδική κατεργασία (25). Υπάρχουν οι εξής επιλογές:

α) απευθείας προσθήκη ποσοτήτων γνωστού βάρους·

β) διασπορά με υπερήχους πριν από την προσθήκη·

γ) διασπορά με τη βοήθεια γαλακτωματοποιητών, για τους οποίους απαιτείται να έχει διαπιστωθεί αν έχουν ανασταλτική ή διεγερτική επίδραση στη μικροβιακή δραστηριότητα, πριν από την προσθήκη·

δ) προσρόφηση υγρών ελεγχόμενων χημικών ουσιών ή διαλύματος σε κατάλληλο πτητικό διαλύτη σε αδρανές μέσο ή στήριγμα (π.χ. φίλτρο γυάλινων ινών), ακολουθούμενη από εξάτμιση του διαλύτη, εάν έχει χρησιμοποιηθεί, και απευθείας προσθήκη γνωστών ποσοτήτων·

ε) προσθήκη γνωστού όγκου διαλύματος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε πολύ πτητικό διαλύτη σε κενό δοχείο δοκιμής, ακολουθούμενη από εξάτμιση του διαλύτη.

Τα μέσα ή διαλύτες που χρησιμοποιούνται στα στοιχεία γ), δ) και ε) θα πρέπει να ελέγχονται για διεγερτική ή ανασταλτική επίδραση στη μικροβιακή δραστηριότητα [βλέπε παράγραφο 42 στοιχείο β)].

Χημικές ουσίες αναφοράς

23. Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης της (διαλυτής) χημικής ουσίας αναφοράς σε νερό (παράγραφος 17), με συγκέντρωση κατά προτίμηση 100πλάσια της τελικής συγκέντρωσης που θα χρησιμοποιηθεί (20 mg C/l) στη δοκιμή.

Έλεγχος αναστολής

24. Συχνά, οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες δεν παρουσιάζουν σημαντική αποικοδόμηση υπό τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται στις εκτιμήσεις της άμεσης βιοαποικοδόμησης. Μια πιθανή αιτία είναι ότι η ελεγχόμενη ουσία είναι ανασταλτική για το εμβόλιο στη συγκέντρωση στην οποία εφαρμόζεται στη δοκιμή. Στον σχεδιασμό της δοκιμής μπορεί να περιλαμβάνεται έλεγχος αναστολής για τη διευκόλυνση του χαρακτηρισμού (εκ των υστέρων) της αναστολής ως πιθανής αιτίας ή συμβάλλοντος παράγοντα. Εναλλακτικά, ο έλεγχος αναστολής μπορεί να αποκλείσει αυτή την παρεμποδιστική δράση και να δείξει ότι η μηδενική ή η μικρή αποικοδόμηση οφείλεται αποκλειστικά σε μη επιδεκτικότητα μικροβιακής επίθεσης υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για τους (αερόβιους) μικροοργανισμούς, παρασκευάζεται διάλυμα στο μέσο δοκιμής, που περιέχει την ελεγχόμενη χημική ουσία και τη χημική ουσία αναφοράς (παράγραφος 19) στην ίδια συγκέντρωση, ανά ουσία, με εκείνη που προστέθηκε, αντίστοιχα (βλέπε παραγράφους 22 και 23).

▼M4

Εμβόλιο

25. Το εμβόλιο μπορεί να προέρχεται από ποικιλία πηγών: ενεργός ιλύς, εκροές εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (μη χλωριωμένες), επιφανειακά ύδατα και εδάφη ή από συνδυασμό αυτών (20). Η βιοαποικοδομητική δραστηριότητα της πηγής θα πρέπει να ελέγχεται με τη χρήση χημικής ουσίας αναφοράς. Ανεξάρτητα από την πηγή, οι μικροοργανισμοί που έχουν προηγουμένως εκτεθεί στην ελεγχόμενη χημική ουσία δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν η διαδικασία πρόκειται να εφαρμοστεί ως δοκιμή άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας.

Προειδοποίηση: Η ενεργός ιλύς, τα λύματα και οι εκροές εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων περιέχουν παθογόνους οργανισμούς και απαιτούν προσεκτικό χειρισμό.

26. Βάσει εμπειρίας, ο βέλτιστος όγκος για το εμβόλιο είναι εκείνος που:

— είναι επαρκής για να επιτευχθεί κατάλληλη βιοαποικοδομητική δραστηριότητα,

— αποικοδομεί τη χημική ουσία αναφοράς κατά το ποσοστό που ορίζεται (βλέπε παράγραφο 66),

— αποδίδει 10^2 έως 10^5 μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά χιλιοστόλιτρο στο τελικό μείγμα,

— συνήθως αποδίδει συγκέντρωση 4 mg/l αιωρούμενων στερεών στο τελικό μείγμα, όταν χρησιμοποιείται ενεργός ιλύς· μπορούν να χρησιμοποιηθούν συγκεντρώσεις έως 30 mg/l, αλλά ενδέχεται να αυξήσουν σημαντικά την παραγωγή CO_2 των τυφλών (26),

— συνεισφέρει λιγότερο από το 10 % της αρχικής συγκέντρωσης του οργανικού άνθρακα που εισάγεται με τη χημική δοκιμή,

— είναι γενικά 1-10 ml εμβολίου ανά λίτρο διαλύματος δοκιμής.

Ενεργός ιλύς

27. Συλλέγεται πρόσφατη ενεργός ιλύς από τη δεξαμενή αερισμού μιας εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων ή εργαστηριακής μονάδας, που επεξεργάζεται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα. Εάν είναι απαραίτητο, θα πρέπει να απομακρύνονται τα χονδρόκοκκα σωματίδια με κοσκίνισμα (π.χ. με κόσκινο του 1 mm^2) και η ιλύς να διατηρείται σε αερόβια κατάσταση μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

28. Εναλλακτικά, μετά από την αφαίρεση τυχόν χονδρόκοκκων σωματιδίων, προβείτε σε καθίζηση ή φυγοκέντρηση (π.χ. 1 100 × g για 10 λεπτά). Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται. Η ιλύς μπορεί να εκπλυθεί με το ανόργανο διάλυμα. Σχηματίζεται εναιώρημα της συμπυκνωμένης ιλύος σε ανόργανο μέσο για να επιτευχθεί συγκέντρωση 3-5 g αιωρούμενων στερεών/l. Ακολουθεί αερισμός, όσο απαιτείται.

29. Η ιλύς πρέπει να λαμβάνεται από συμβατική εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων που λειτουργεί αποτελεσματικά. Αν η ιλύς πρέπει να ληφθεί από εγκατάσταση επεξεργασίας υψηλής παραγωγικότητας ή θεωρείται ότι περιέχει αναστολείς, θα πρέπει να εκπλύνεται. Η επαναφερθείσα σε μορφή εναιωρήματος ιλύς αφήνεται να καθιζήσει ή φυγοκεντρείται, μετά από επιμελή ανάμειξη, το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και σχηματίζεται εναιώρημα της πλυμένης ιλύος σε νέο όγκο ανόργανου μέσου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να κριθεί ότι η ιλύς είναι απαλλαγμένη από περίσσεια υποστρώματος ή αναστολέα.

30. Αφού επιτευχθεί πλήρης επαναιώρηση ή σε περίπτωση ανεπεξέργαστης ιλύος, λαμβάνεται δείγμα ακριβώς πριν από τη χρήση, για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους των αιωρούμενων στερεών.

31. Μια εναλλακτική λύση είναι η ομοιογενοποίηση της ενεργού ιλύος (3-5 g αιωρούμενων στερεών/l). Η ιλύς υποβάλλεται σε κατεργασία σε αναμείκτη Waring για 2 λεπτά με μεσαία ταχύτητα. Η αναμειγμένη ιλύς αφήνεται να καθιζήσει για χρονικό διάστημα 30 λεπτών ή και περισσότερο εάν αυτό απαιτείται και το υγρό μεταγγίζεται για να χρησιμοποιηθεί σαν εμβόλιο σε αναλογία περίπου 10 ml/l ανόργανου μέσου.

▼M4

32. Περαιτέρω μείωση της έκλυσης CO_2 στο τυφλό μπορεί να επιτευχθεί με ολονύκτιο αερισμό της ιλύος με αέρα απαλλαγμένο από CO_2. Χρησιμοποιούνται 4 mg/l στερεών ενεργού ιλύος, όσο και η συγκέντρωση του εμβολίου στη δοκιμή αυτή (13).

Δευτεροβάθμιες εκροές εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων

33. Εναλλακτικά, το εμβόλιο μπορεί να προέρχεται από τις δευτεροβάθμιες εκροές εγκατάστασης επεξεργασίας ή μονάδας εργαστηριακής κλίμακας για οικιακά, κατά κύριο λόγο, λύματα. Διατηρείται το δείγμα υπό αερόβιες συνθήκες και χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής ή προεγκλιματίζεται, εάν είναι απαραίτητο. Οι εκροές θα πρέπει να διηθούνται με χονδρό ηθμό για την απομάκρυνση των χονδρών σωματιδίων. Μετράται το pH.

34. Για να μειωθεί η περιεκτικότητα σε IC, ψεκάζεται στο διήθημα αέρας απαλλαγμένος από CO_2 [παράγραφος 15 στοιχείο ε)] για 1 ώρα, ενώ διατηρείται το pH στο 6,5 με ορθοφωσφορικό οξύ (παράγραφος 20). Το pH αποκαθίσταται στην αρχική του τιμή με υδροξείδιο του νατρίου (παράγραφος 21) και, μετά από καθίζηση για περίπου 1 ώρα, λαμβάνεται κατάλληλος όγκος του υπερκείμενου υγρού για εμβολιασμό. Η συγκεκριμένη διαδικασία ψεκασμού μειώνει την περιεκτικότητα του εμβολίου σε IC. Για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο ο μέγιστος συνιστώμενος όγκος ψεκασμένου διηθήματος εκροής (100 ml) ανά λίτρο, η ποσότητα του IC στα τυφλά δοχεία-μάρτυρες κυμαινόταν μεταξύ 0,4 και 1,3 mg/l (14), τιμές που αντιστοιχούν σε 2-6,5 % της ελεγχόμενης χημικής ουσίας C σε συγκέντρωση 20 mg% C/l και 4-13 % σε συγκέντρωση 10 mg C/l.

Επιφανειακά ύδατα

35. Λαμβάνεται δείγμα από κατάλληλα επιφανειακά ύδατα. Θα πρέπει να διατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες και να χρησιμοποιούνται την ημέρα της συλλογής. Το δείγμα θα πρέπει να συμπυκνωθεί, εφόσον είναι αναγκαίο, με διήθηση ή φυγοκέντρηση. Ο όγκος του εμβολίου που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε δοχείο δοκιμής πρέπει να πληροί τα κριτήρια που αναφέρονται στην παράγραφο 26.

Εδάφη

36. Λαμβάνεται δείγμα κατάλληλου εδάφους, το οποίο συλλέγεται από βάθος μέχρι 20 cm κάτω από την επιφάνεια του εδάφους. Τυχόν πέτρες, υπολείμματα φυτών και ασπόνδυλα θα πρέπει να αφαιρούνται από το δείγμα εδάφους, πριν αυτό κοσκινιστεί με κόσκινο των 2 mm (εάν το δείγμα είναι πολύ υγρό για να κοσκινιστεί αμέσως, ξηραίνεται μερικώς στον αέρα για να διευκολυνθεί το κοσκίνισμα). Θα πρέπει να διατηρείται υπό αερόβιες συνθήκες και να χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής (εάν το δείγμα μεταφέρεται σε χαλαρά κλεισμένη σακούλα από μαύρο πολυαιθυλένιο, μπορεί να αποθηκεύεται στους 2 έως 4 °C μέσα στη σακούλα για χρονικό διάστημα έως ενός μήνα).

Προεγκλιματισμός του εμβολίου

37. Το εμβόλιο μπορεί να προεγκλιματίζεται στις πειραματικές συνθήκες, δεν μπορεί όμως να προσαρμόζεται εκ των προτέρων στην εξεταζόμενη ουσία. Ο προεγκλιματισμός μπορεί να μειώσει την τυφλή έκλυση CO_2. Ο προεγκλιματισμός συνίσταται από τον αερισμό της ενεργού ιλύος μετά από αραίωση σε μέσο δοκιμής σε 30 mg/l με υγρό αέρα απαλλαγμένο από CO_2 για μέχρι 5-7 ημέρες, στη θερμοκρασία της δοκιμής.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΩΝ

Αριθμός φιαλών

38. Ο αριθμός των φιαλών (παράγραφος 15-α) που απαιτούνται για μια δοκιμή θα εξαρτηθεί από τη συχνότητα της ανάλυσης και τη διάρκεια της δοκιμής.

39. Συνιστάται η ανάλυση των τριπλότυπων φιαλών μετά από επαρκή χρονικά διαστήματα, ούτως ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός του 10ήμερου χρονικού διαστήματος. Επίσης, αναλύονται τουλάχιστον πέντε φιάλες δοκιμής (παράγραφος 15-α) από τα σύνολα α), β) και γ) (βλέπε παράγραφο 42) στο τέλος της δοκιμής, για να καταστεί δυνατός ο υπολογισμός του 95 % των διαστημάτων εμπιστοσύνης για τη μέση τιμή της ποσοστιαίας βιοαποικοδόμησης.

▼M4

Εμβολιασμένο μέσο

40. Το εμβόλιο χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 4 mg/l ξηρών στερεών ενεργού ιλύος. Αμέσως πριν από τη χρήση, παρασκευάζεται επαρκές εμβολιασμένο μέσο με την προσθήκη, για παράδειγμα, 2 ml καταλλήλως επεξεργασμένης ενεργού ιλύος (παράγραφοι 27 έως 32) με συγκέντρωση 2 000 mg/l σε 1 λίτρο μέσου ανόργανων αλάτων (παράγραφος 19). Όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν δευτεροβάθμιες εκροές, προστίθενται έως 100 ml εκροής (παράγραφος 33) σε 900 ml μέσου ανόργανων αλάτων (παράγραφος 19) και το σύνολο αραιώνεται μέχρι το 1 λίτρο με το μέσο αυτό.

Ετοιμασία των φιαλών

41. Γνωστά κλάσματα του εμβολιασμένου μέσου διανέμονται σε πολλαπλές φιάλες για να προκύψει αναλογία υπερκείμενου χώρου-υγρού 1:2 (π.χ. προσθήκη 107 ml σε φιάλες χωρητικότητας 160 ml). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες αναλογίες, θα πρέπει όμως να ληφθεί υπόψη η προειδοποίηση της παραγράφου 11. Κατά τη χρήση οποιουδήποτε τύπου εμβολίου, πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την επαρκή ανάμειξη του εμβολιασμένου μέσου, ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιόμορφη κατανομή του στις φιάλες δοκιμής.

42. Ετοιμάζονται σειρές φιαλών [παράγραφος 15 στοιχείο α)] που περιλαμβάνουν τα εξής:

α) δοχεία δοκιμής (συμβολίζονται με F_T) που περιέχουν την ελεγχόμενη χημική ουσία·

β) τυφλούς μάρτυρες (συμβολίζονται με F_B) που περιέχουν μόνο το μέσο δοκιμής και το εμβόλιο. Πρέπει επίσης να προστίθενται τυχόν χημικές ουσίες, διαλύτες, μέσα ή φίλτρα από ίνες γυαλιού που χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής·

γ) δοχεία (συμβολίζονται με F_C) για τον έλεγχο της διαδικασίας, τα οποία περιέχουν τη χημική ουσία αναφοράς·

δ) εάν χρειάζεται, δοχεία (συμβολίζονται με F_I) για τον έλεγχο της πιθανής ανασταλτικής επίδρασης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα οποία περιέχουν τόσο την ελεγχόμενη χημική ουσία, όσο και τη χημική ουσία αναφοράς, στις ίδιες συγκεντρώσεις (παράγραφος 24) όπως στις φιάλες F_T και F_C, αντίστοιχα·

ε) δοχεία (συμβολίζονται με F_S) για τον έλεγχο της πιθανής αβιοτικής αποικοδόμησης, όπως εκείνα του στοιχείου α) με 50 mg/l $HgCl_2$ ή αποστειρωμένα με άλλα μέσα (π.χ. σε αυτόκαυστο).

43. Οι υδατοδιαλυτές ελεγχόμενες χημικές ουσίες και χημικές ουσίες αναφοράς προστίθενται ως υδατικά διαλύματα παρακαταθήκης (παράγραφοι 22, 23 και 24) για να προκύψει συγκέντρωση 10 έως 20 mg C/l.

44. Οι αδιάλυτες ελεγχόμενες χημικές ουσίες και χημικές ουσίες αναφοράς προστίθενται σε φιάλες με διάφορους τρόπους [βλέπε παράγραφο 22 στοιχεία α)-ε)], ανάλογα με τη φύση των ελεγχόμενων χημικών ουσιών, είτε πριν είτε μετά την προσθήκη του εμβολιασμένου μέσου, ανάλογα με τη μέθοδο επεξεργασίας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται μία από τις διαδικασίες που αναφέρονται στην παράγραφο 22α-ε, τότε οι κενές φιάλες F_B (παράγραφος 42β) πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία με παρόμοιο τρόπο, αλλά εξαιρουμένης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή της χημικής ουσίας αναφοράς.

45. Οι πτητικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να εγχέονται σε σφραγισμένες φιάλες (παράγραφος 47), με τη χρήση μικροσύριγγας. Η δόση υπολογίζεται από τον όγκο που εμβολιάζεται και την πυκνότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

46. Όπου είναι αναγκαίο, θα πρέπει να προστίθεται στα δοχεία νερό, ούτως ώστε να προκύπτει ο ίδιος όγκος υγρού σε κάθε δοχείο. Πρέπει να διασφαλίζεται ότι η αναλογία υπερκείμενου χώρου-υγρού (συνήθως 1:2) και η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι τέτοιες ώστε να είναι διαθέσιμο επαρκές οξυγόνο στον υπερκείμενο χώρο που να επιτρέπει την πλήρη βιοαποικοδόμηση.

▼M4

47. Όλες οι φιάλες στη συνέχεια σφραγίζονται, για παράδειγμα, με διαφράγματα από ελαστικό βουτυλίου και πώματα αλουμινίου. Σε αυτό το στάδιο, θα πρέπει να προστίθενται οι πτητικές ελεγχόμενες χημικές ουσίες (παράγραφος 45). Εάν πρέπει, αφενός, να παρακολουθείται η μείωση στη συγκέντρωση DOC του διαλύματος δοκιμής και, αφετέρου, να εκτελούνται αναλύσεις σε χρόνο μηδέν για την αρχική συγκέντρωση IC [στείροι μάρτυρες, παράγραφος 42 στοιχείο ε)] ή άλλων προσδιοριζόμενων στοιχείων, λαμβάνεται κατάλληλο δείγμα από το δοχείο δοκιμής. Στη συνέχεια, το δοχείο δοκιμής και το περιεχόμενό του απορρίπτονται.

48. Οι σφραγισμένες φιάλες τοποθετούνται σε περιστροφικό τάρακτρο [παράγραφος 15 στοιχείο δ)], με ταχύτητα ανακίνησης που επαρκεί για να διατηρεί το περιεχόμενο της φιάλης καλά αναμιγνυόμενο και σε εναιώρημα (π.χ. 150 έως 200 στροφές ανά λεπτό), και επωάζονται στο σκοτάδι, στους 20 °C ± 1 °C.

Δειγματοληψία

49. Η μέθοδος της δειγματοληψίας εξαρτάται από την περίοδο υστέρησης και την κινητική ταχύτητα βιοαποικοδόμησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Φιάλες χρησιμοποιούνται για ανάλυση την ημέρα της δειγματοληψίας, η οποία πρέπει να λαμβάνει χώρα τουλάχιστον εβδομαδιαία ή και πιο συχνά (π.χ. δύο φορές την εβδομάδα) εάν απαιτείται πλήρης καμπύλη αποικοδόμησης. Λαμβάνεται από το τάρακτρο ο απαιτούμενος αριθμός πολλαπλών φιαλών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις φιάλες F_T, F_B και F_C και, αν χρησιμοποιούνται, τις F_I και F_S (βλέπε παράγραφο 42). Η κανονική διάρκεια της δοκιμής είναι 28 ημέρες. Εάν η καμπύλη βιοαποικοδόμησης δείχνει ότι έχει επιτευχθεί οριζοντίωση πριν από την 28η ημέρα, η δοκιμή μπορεί να περατωθεί νωρίτερα. Λαμβάνονται για ανάλυση δείγματα από τις πέντε φιάλες που προορίζονται για την 28η ημέρα της δοκιμής και τα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης ή του συντελεστή μεταβλητότητας της ποσοστιαίας βιοαποικοδόμησης. Από τις φιάλες που εξυπηρετούν τους ελέγχους της αναστολής και της αβιοτικής αποικοδόμησης δεν χρειάζεται να λαμβάνονται δείγματα τόσο συχνά όσο από τις άλλες φιάλες: αρκούν η 1η και η 28η ημέρα.

Ανάλυση ανόργανου άνθρακα (IC)

50. Η παραγωγή CO_2 στις φιάλες προσδιορίζεται με μέτρηση της αύξησης της συγκέντρωσης του ανόργανου άνθρακα (IC) κατά τη διάρκεια της επώασης. Διατίθενται δύο συνιστώμενες μέθοδοι για τη μέτρηση της ποσότητας του IC που παράγεται κατά τη δοκιμή και περιγράφονται κατωτέρω. Δεδομένου ότι οι μέθοδοι μπορεί να δώσουν ελαφρώς διαφορετικά αποτελέσματα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μόνο μία για όλες τις μετρήσεις μιας δοκιμής.

51. Η μέθοδος α) συνιστάται, εάν το μέσο είναι πιθανό να περιέχει υπολείμματα, για παράδειγμα, γυάλινου διηθητικού χαρτιού και/ή αδιάλυτης ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Η ανάλυση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας έναν αεριοχρωματογράφο, σε περίπτωση που δεν διατίθεται αναλυτής άνθρακα. Κατά την ανάλυση του αερίου του υπερκείμενου χώρου, είναι σημαντικό οι φιάλες να είναι στη θερμοκρασία ή κοντά στη θερμοκρασία της δοκιμής. Η μέθοδος (β) μπορεί να είναι ευκολότερη για τα εργαστήρια που χρησιμοποιούν αναλυτές άνθρακα για τη μέτρηση του IC. Είναι σημαντικό το διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (παράγραφος 21) που χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του CO_2 σε ανθρακικό να είναι είτε προσφάτως παρασκευασμένο είτε η περιεκτικότητά του σε IC να είναι γνωστή, ούτως ώστε αυτό να μπορεί να λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων της δοκιμής (βλέπε παράγραφο 66-β.)

Μέθοδος α): οξίνιση μέχρι pH < 3

52. Πριν από κάθε παρτίδα αναλύσεων, ο αναλυτής IC βαθμονομείται χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο IC πρότυπο (π.χ. 1 % w/w CO_2 σε N_2). Πυκνό ορθοφωσφορικό οξύ (παράγραφος 20) εγχέεται μέσω του διαφράγματος κάθε φιάλης από την οποία έχει ληφθεί δείγμα για να μειώσει το pH του μέσου σε < 3 (π.χ. προσθήκη 1 ml σε 107 ml μέσου δοκιμής). Οι φιάλες τοποθετούνται και πάλι στο τάρακτρο. Μετά από ανακίνηση επί μία ώρα στη θερμοκρασία δοκιμής, απομακρύνονται οι φιάλες από το τάρακτρο, αφαιρούνται γνωστά κλάσματα αερίου (π.χ. 1 ml) από τον υπερκείμενο χώρο κάθε φιάλης και εγχέονται στον αναλυτή IC. Οι μετρούμενες συγκεντρώσεις IC καταγράφονται ως mg C/l.

▼M4

53. Η αρχή της παρούσας μεθόδου είναι ότι μετά την οξίνιση σε pH<3 και την εξισορρόπηση στους 20 °C, η σταθερά ισορροπίας για την κατανομή του CO_2 μεταξύ των υγρών και αερίων φάσεων στις φιάλες δοκιμής είναι 1,0, όταν μετράται ως συγκέντρωση (13). Αυτό θα πρέπει να αποδεικνύεται για το σύστημα δοκιμής τουλάχιστον μία φορά ως εξής:

Ετοιμάζονται φιάλες που περιέχουν 5 και 10 mg/l ως IC, με τη χρήση διαλύματος άνυδρου ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) σε απαλλαγμένο από CO_2 νερό, το οποίο παρασκευάζεται με οξίνιση νερού μέχρι pH 6,5 με πυκνό ορθοφωσφορικό οξύ (παράγραφος 20), ολονύκτιο ψεκασμό με απαλλαγμένο από CO_2 αέρα και, τέλος, εξουδετέρωση του pH με αλκάλιο. Εξακριβώνεται ότι η αναλογία όγκων υπερκείμενου χώρου και υγρού είναι η ίδια όπως και στις δοκιμές (π.χ. 1:2). Ακολουθεί οξίνιση και εξισορρόπηση, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 52, και μέτρηση των συγκεντρώσεων IC, τόσο στην υπερκείμενη όσο και στην υγρή φάση. Ελέγχεται αν οι δύο συγκεντρώσεις είναι ίδιες, εντός των ορίων του πειραματικού σφάλματος. Εάν δεν είναι, ο τεχνικός θα πρέπει να επανεξετάσει τις διαδικασίες. Ο έλεγχος αυτός της κατανομής του IC μεταξύ υγρής και αέριας φάσης δεν είναι αναγκαίος κάθε φορά που διεξάγεται η δοκιμή. Τεκμαίρεται ότι διενεργείται κατά τη βαθμονόμηση.

54. Εάν πρόκειται να μετρηθεί η απομάκρυνση DOC (μόνο για υδατοδιαλυτές ελεγχόμενες χημικές ουσίες), τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται από την υγρή φάση από ξεχωριστές (μη οξινισμένες) φιάλες, να διηθούνται με μεμβράνη και να εισάγονται στον αναλυτή DOC. Οι φιάλες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για άλλες αναλύσεις, ανάλογα με τις ανάγκες, με σκοπό τη μέτρηση της πρωτοβάθμιας βιοαποικοδόμησης.

Μέθοδος β): μετατροπή του CO_2 σε ανθρακικό άλας

55. Πριν από κάθε παρτίδα αναλύσεων, ο αναλυτής IC βαθμονομείται με κατάλληλο πρότυπο – για παράδειγμα, διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου ($NaHCO_3$) σε νερό απαλλαγμένο από CO_2 (βλέπε παράγραφος 53) με συγκέντρωση 0 έως 20 mg/l ως IC. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (7M, παράγραφος 21) (π.χ. 1 ml σε 107 ml μέσου) εγχέεται μέσω του διαφράγματος του δείγματος κάθε φιάλης και οι φιάλες ανακινούνται για 1 ώρα στη θερμοκρασία δοκιμής. Χρησιμοποιείται το ίδιο διάλυμα NaOH σε όλες τις φιάλες που αποσύρονται μια συγκεκριμένη ημέρα, αλλά όχι απαραίτητα σε όλες τις δειγματοληψίες καθ' όλη τη δοκιμή. Εάν απαιτούνται τυφλές απόλυτες τιμές του IC σε όλες τις δειγματοληψίες, οι προσδιορισμοί του IC στο διάλυμα NaOH θα απαιτούνται κάθε φορά που αυτό χρησιμοποιείται. Οι φιάλες απομακρύνονται από το τάρακτρο και αφήνονται σε ηρεμία. Αφαιρούνται με σύριγγα κατάλληλοι όγκοι (π.χ. 50 έως 1 000 μl) της υγρής φάσης κάθε δοχείου. Τα δείγματα εγχέονται στον αναλυτή IC και καταγράφονται οι συγκεντρώσεις IC. Θα πρέπει να εξασφαλίζεται ότι ο χρησιμοποιούμενος αναλυτής είναι κατάλληλα εξοπλισμένος για να ανταποκριθεί στα αλκαλικά δείγματα που παράγονται στην παρούσα μέθοδο.

56. Η αρχή της παρούσας μεθόδου είναι ότι, μετά από την προσθήκη του αλκάλεος και την ανακίνηση, η συγκέντρωση του IC στον υπερκείμενο χώρο είναι αμελητέα. Αυτό θα πρέπει να ελέγχεται για το σύστημα δοκιμής τουλάχιστον μία φορά με τη χρήση προτύπων IC, την προσθήκη αλκαλίου και εξισορρόπηση, και με μέτρηση της συγκέντρωσης του IC τόσο στην υπερκείμενη όσο και στην υγρή φάση (βλέπε παράγραφο 53). Η συγκέντρωση στον υπερκείμενο χώρο θα πρέπει να προσεγγίζει το μηδέν. Ο έλεγχος αυτός για τη σχεδόν πλήρη απορρόφηση του CO_2 δεν χρειάζεται κάθε φορά που διεξάγεται η δοκιμή.

57. Εάν πρόκειται να μετρηθεί η απομάκρυνση DOC (μόνο για υδατοδιαλυτές ελεγχόμενες χημικές ουσίες), τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται από την υγρή φάση από ξεχωριστές φιάλες (οι οποίες δεν περιέχουν προστιθέμενο αλκάλιο), να διηθούνται με μεμβράνη και να εισάγονται στον αναλυτή DOC. Οι φιάλες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για άλλες αναλύσεις, εφόσον είναι αναγκαίο, για τη μέτρηση της πρωταρχικής βιοαποικοδομησιμότητας.

▼M4

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

58. Εάν επιτυγχάνεται 100 % ανοργανοποίηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε CO_2, ο πλεονάζων ThIC που παράγεται στους τυφλούς μάρτυρες ισούται με τον TOC που προστέθηκε σε κάθε φιάλη δοκιμής κατά την έναρξη της δοκιμής, που είναι:

$$ThIC = TOC.$$

Η συνολική μάζα (mg) του ανόργανου άνθρακα (TIC) εντός κάθε φιάλης είναι:

$$TIC = (\text{mg C στο υγρό} + \text{mg C στον υπερκείμενο χώρο}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Εξίσωση [1]}$$

όπου:

V_L = όγκος του υγρού μέσα στη φιάλη (σε λίτρα),

CL = συγκέντρωση του IC στο υγρό (mg/l ως άνθρακας),

VH = όγκος υπερκείμενης αέριας φάσης (headspace) (σε λίτρα),

CH = συγκέντρωση του IC στην υπερκείμενη αέρια φάση (mg/l ως άνθρακας).

Οι υπολογισμοί του TIC για τις δύο αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του IC στη δοκιμή αυτή περιγράφονται κατωτέρω στις παραγράφους 60 και 61. Η ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση (% D) σε κάθε περίπτωση δίνεται από:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{Εξίσωση [2]}$$

όπου:

TICT = mg TIC στη φιάλη δοκιμής στον χρόνο t,

TICb = μέσος TIC σε mg σε τυφλές φιάλες σε χρόνο t,

TOC = mg TOC που προστέθηκε αρχικά στο δοχείο δοκιμής.

Η ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση σε ποσοστό % D υπολογίζεται για τις φιάλες δοκιμής (F_T), αναφοράς (F_C) και, εάν συμπεριλαμβάνεται, τη φιάλη ελέγχου παρακολούθησης της αναστολής (F_I) από τα αντίστοιχα ποσά του TIC που παράγεται σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας.

59. Εάν έχει επέλθει σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας του TIC στους στείρους μάρτυρες (F_S) κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής, τότε μπορεί να συναχθεί ότι έχει πραγματοποιηθεί η αβιοτική αποικοδόμηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη στον υπολογισμό του D στην εξίσωση [2].

Οξίνιση σε pH < 3

60. Δεδομένου ότι η οξίνιση σε pH < 3 και η εξισορρόπηση έχουν ως αποτέλεσμα την εξισορρόπηση της συγκέντρωσης TIC στις υγρές και αέριες φάσεις, θα πρέπει να μετράται μόνον η συγκέντρωση του IC στην αέρια φάση. Επομένως, από την Εξίσωση [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, όπου V_B = όγκος της φιάλης ορού.

Μετατροπή του CO_2 σε ανθρακικό άλας

61. Στη μέθοδο αυτή οι υπολογισμοί πραγματοποιούνται όπως στην Εξίσωση [1], αλλά η αμελητέα ποσότητα του IC στην αέρια φάση αγνοείται, δηλαδή $V_H \times C_H = 0$, και $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Έκφραση των αποτελεσμάτων

62. Η καμπύλη βιοαποικοδόμησης λαμβάνεται με γραφική παράσταση του ποσοστού βιοαποικοδόμησης, D, σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης και, εάν είναι δυνατόν, υποδεικνύονται η λανθάνουσα φάση, η φάση βιοαποικοδόμησης, το 10ήμερο χρονικό διάστημα και η φάση οριζοντίωσης, δηλαδή η φάση κατά την οποία επιτεύχθηκε η μέγιστη αποικοδόμηση και η σταθεροποιήθηκε η καμπύλη βιοαποικοδόμησης. Εάν λαμβάνονται συγκρίσιμα αποτελέσματα για δοχεία παράλληλης δοκιμής F_T (διαφορά < 20 %), χαράσσεται μια μέση καμπύλη (βλέπε προσάρτημα 2, σχήμα1). Εάν όχι, χαράσσονται καμπύλες για κάθε δοχείο. Προσδιορίζεται η μέση τιμή της ποσοστιαίας βιοαποικοδόμησης στη φάση οριζοντίωσης ή εκτιμάται η υψηλότερη τιμή (π.χ. όταν η καμπύλη μειώνεται στη φάση οριζοντίωσης), αλλά είναι σημαντικό να εκτιμηθεί ότι στην τελευταία αυτή περίπτωση η τιμή δεν αποτελεί έκτοπη τιμή. Στην έκθεση δοκιμής, αυτό το μέγιστο επίπεδο βιοαποικοδόμησης αναφέρεται ως ο «βαθμός βιοαποικοδόμησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας». Εάν ο αριθμός των δοχείων δοκιμής ήταν ανεπαρκής για να υποδηλώσει φάση οριζοντίωσης, χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό μέσης τιμής τα μετρούμενα δεδομένα της τελευταίας ημέρας της δοκιμής. Η τελευταία αυτή τιμή, ο μέσος όρος των πέντε επαναλήψεων, χρησιμεύει για να δείξει την ακρίβεια με την οποία προσδιορίσθηκε η ποσοστιαία βιοαποικοδόμηση. Αναφέρεται επίσης η τιμή που λαμβάνεται στο τέλος του 10ήμερου χρονικού διαστήματος.

63. Κατά τον ίδιο τρόπο, χαράσσεται καμπύλη για τη χημική ουσία αναφοράς, F_C, και, εάν συμπεριλαμβάνεται, για τον έλεγχο της αβιοτικής απομάκρυνσης, F_S, και τον μάρτυρα αναστολής, F_I.

64. Καταγράφονται οι ποσότητες του TIC που υπάρχει στους τυφλούς μάρτυρες (F_B), όπως και οι αντίστοιχες των φιαλών F_S (αβιοτικός έλεγχος), εάν τα δοχεία αυτά είχαν συμπεριληφθεί στη δοκιμή.

65. Υπολογίζεται η D για τα δοχεία F_I, με βάση τη θεωρητική απόδοση IC που αναμένεται μόνο από το συστατικό αναφοράς του μείγματος. Εάν, κατά την 28η ημέρα, $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, μπορεί να υποτεθεί ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία ανέστειλε τη δραστηριότητα του εμβολίου, το οποίο μπορεί να εξηγεί τις χαμηλές τιμές του D_{FT} που λαμβάνονται υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή η δοκιμή θα μπορούσε να επαναληφθεί με χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής και κατά προτίμηση με μείωση του DIC στο εμβόλιο και του TIC που σχηματίζεται στους τυφλούς μάρτυρες, δεδομένου ότι διαφορετικά η χαμηλότερη συγκέντρωση θα υποβαθμίσει την ακρίβεια της μεθόδου. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλο εμβόλιο. Εάν, σε φιάλη F_S (αβιοτική) παρατηρείται σημαντική αύξηση (> 10 %) της ποσότητας του TIC, μπορεί να έχουν υπάρξει διεργασίες αβιοτικής αποικοδόμησης.

Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων

66. Μια δοκιμή θεωρείται έγκυρη εφόσον:

α) η μέση ποσοστιαία αποικοδόμηση στα δοχεία F_C που περιέχουν τη χημική ουσία αναφοράς είναι > 60 % κατά την 14η ημέρα της επώασης και

β) η μέση ποσότητα του TIC στους τυφλούς μάρτυρες F_B στο τέλος της δοκιμής είναι > 3 mg C/l.

Εάν δεν πληρούνται τα όρια αυτά, πρέπει να επαναληφθεί η δοκιμή με εμβόλιο από άλλη πηγή και/ή να επανεξεταστούν οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, εάν η υψηλή παραγωγή IC στους τυφλούς μάρτυρες αποτελεί πρόβλημα, θα πρέπει να ακολουθείται η διαδικασία που προβλέπεται στις παραγράφους 27 έως 32.

(1) Η ποσοστιαία αποικοδόμηση στα δοχεία F_C που περιέχουν την ουσία αναφοράς.
(2) Η ποσοστιαία αποικοδόμηση στα δοχεία F_I.

▼M4

67. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν φθάσει το 60 % ThIC και αποδειχθεί ότι δεν είναι ανασταλτική (παράγραφος 65), η δοκιμή μπορεί να επαναληφθεί με αυξημένη συγκέντρωση εμβολίου (έως 30 mg/l ενεργού ιλύος και 100 ml εκροής/l) ή εμβόλια από άλλες πηγές, ιδίως εάν η αποικοδόμηση κυμαινόταν μεταξύ 20 και 60 %.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

68. Η βιοαποικοδόμηση > 60 % ThIC εντός του 10ήμερου χρονικού διαστήματος στην παρούσα δοκιμή αποδεικνύει ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι άμεσα βιοαποικοδομήσιμη υπό αερόβιες συνθήκες.

69. Εάν δεν επιτευχθεί η τιμή επιτυχίας του 60 % ThIC, προσδιορίζεται το pH των μέσων σε φιάλες δεν έχουν καταστεί όξινες ή αλκαλικές. Μια τιμή μικρότερη από 6,5 θα μπορούσε να υποδηλώνει νιτροποίηση. Σε μια τέτοια περίπτωση η δοκιμή επαναλαμβάνεται με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλότερης συγκέντρωσης.

Έκθεση δοκιμής

70. Καταρτίζεται πίνακας των ποσοστών % D για κάθε φιάλη δοκιμής (F_T), αναφοράς (F_C) και, εάν συμπεριλαμβάνεται, για τη φιάλη μάρτυρα αναστολής (F_I) ανά ημέρα δειγματοληψίας. Εάν προέκυψαν συγκρίσιμα αποτελέσματα για τις πολλαπλές φιάλες, χαράσσεται καμπύλη της μέσης % D συναρτήσει του χρόνου. Καταγράφεται η ποσότητα του TIC στους τυφλούς (F_B) και τους στείρους μάρτυρες (F_S), του DOC και/ή άλλων προσδιοριζόμενων στοιχείων, καθώς και η ποσοστιαία απομάκρυνσή τους.

71. Προσδιορίζεται η μέση τιμή της % D στη φάση οριζοντίωσης ή λαμβάνεται η υψηλότερη τιμή, εάν η καμπύλη βιοαποικοδόμησης δεν παρουσιάζει οριζοντίωση, και αναφέρεται ως ο «βαθμός βιοαποικοδόμησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας». Είναι σημαντικό να εξασφαλίζεται ότι στη δεύτερη περίπτωση, η υψηλότερη τιμή δεν αποτελεί έκτοπη τιμή.

72. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,

— καθαρότητα (ξένες προσμείξεις) της ελεγχόμενης ουσίας.

Συνθήκες δοκιμής:

— αναφορά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών,

— περιγραφή του χρησιμοποιούμενου συστήματος δοκιμής (π.χ. όγκος του δοχείου, αναλογία υπερκείμενου χώρου προς υγρό, μέθοδος ανάδευσης κ.λπ.),

— εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και της χημικής ουσίας αναφοράς στο σύστημα δοκιμής: η συγκέντρωση δοκιμής που χρησιμοποιείται και η ποσότητα του διοξειδίου του άνθρακα που χορηγείται σε κάθε φιάλη δοκιμής, οποιαδήποτε χρήση διαλυτών,

— οι λεπτομέρειες του χρησιμοποιούμενου εμβολίου, οποιαδήποτε προεπεξεργασία και προεγκλιματισμός,

— θερμοκρασία επώασης,

— εγκυρότητα της αρχής της ανάλυσης IC,

— κύρια χαρακτηριστικά του αναλυτή IC που χρησιμοποιείται (και οποιεσδήποτε άλλες αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται),

— πλήθος πολλαπλών δοχείων (replicates).

Αποτελέσματα:

— ανεπεξέργαστα δεδομένα και υπολογισμένες τιμές της βιοαποικοδομησιμότητας σε μορφή πίνακα,

▼**M4**

— γραφική παράσταση του ποσοστού αποικοδόμησης συναρτήσει του χρόνου για τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες και τις χημικές ουσίες αναφοράς, της λανθάνουσας φάσης, της φάσης αποικοδόμησης, του 10ήμερου χρονικού διαστήματος και κλίση,

— ποσοστιαία απομάκρυνση στη φάση σταθερής κατάστασης, στο τέλος της δοκιμής, και μετά το 10ήμερο χρονικό διάστημα,

— αιτιολογία οποιασδήποτε απόρριψης των αποτελεσμάτων των δοκιμών,

— οποιαδήποτε άλλα γεγονότα συναφή με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας – Δοκιμή έκλυσης CO_2 (Μέθοδος Γ.4-Γ).

(2) Sturm R.N. (1973), Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation, *J. A. Oil Chem. Soc.* 50: 159-167.

(3) Larson R.J. (1979), Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, *Appl. Env. Microbiol.* 38: 1153-1161.

(4) Larson R.J., Hansmann M.A. και Bookland E.A. (1996), Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, *Chemosphere* 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990, revised 1999), Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

(6) US EPA (1996), Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996), Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill W.E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate, *Appl Microbiol.* 30: 922-929.

(9) Weytjens D., Van Ginneken I. και Painter H.A. (1994), The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability, *Chemosphere* 28: 801-812.

(10) Ennis D.M. και Kramer A. (1975), A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides, *J. Food Sci.* 40: 181-185.

(11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzoccki P.H. και Bailey P.H. (1978), *Appl. Env. Microbiol.* 35: 51-53.

(12) Boatman R.J., Cunningham S.L. και Ziegler D.A. (1986), A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, *Env. Toxicol. Chem.* 5: 233-243.

(13) Struijs J. και Stoltenkamp J. (1990), Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test, *Ecotox. Env. Safety* 19: 204-211.

(14) Birch R.R. και Fletcher R.J. (1991), The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability, *Chemosphere* 23: 507-524.

(15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., και Bontinck W.J. (1989), Screening of chemicals for anaerobic biodegradation, *Chemosphere* 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593 (1999), Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO_2 headspace test).

(17) Battersby N.S. (1997), The ISO headspace CO_2 biodegradation test, *Chemosphere* 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996), Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R. και Starkey M. (1999), An «inherent» biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test, *Chemosphere* 38: 3219-3235.

(20) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός «άμεσης» βιοαποικοδομησιμότητας.

(21) OECD (1988), OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto, MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki, CITI). Paris.

(22) Κεφάλαιο Γ.11 του παρόντος παραρτήματος: Ενεργός ιλύς — έλεγχος αναστολής της αναπνοής.

(23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. και Dekkers A.L.M. (1995), A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests, *Biodegradation* 6: 319-327.

(24) EU (1999), Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996), Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Προσάρτημα 1

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

10ήμερο χρονικό διάστημα: Οι δέκα ημέρες αμέσως μετά την επίτευξη αποικοδόμησης 10 %.

DIC: Διαλυμένος ανόργανος άνθρακας

DOC: Διαλυμένος οργανικός άνθρακας είναι ο οργανικός άνθρακας που υπάρχει σε διάλυμα ή διέρχεται από φίλτρο των 0,45 μικρομέτρων ή παραμένει στο υπερκείμενο υγρό μετά από φυγοκέντρηση σε περίπου 4 000 g (περίπου 40 000 m sec^{-2}) επί 15 λεπτά.

IC: Ανόργανος άνθρακας

ThCO_2: Θεωρητικό διοξείδιο του άνθρακα (mg) είναι η ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα που υπολογίζεται ότι παράγεται από τη γνωστή ή μετρούμενη περιεκτικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε άνθρακα, όταν ανοργανοποιείται πλήρως. Εκφράζεται επίσης σε mg διοξειδίου του άνθρακα που εκλύεται ανά mg ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

ThIC: Θεωρητικός ανόργανος άνθρακας

TIC: Ολικός ανόργανος άνθρακας

Ανοργανοποίηση: Ανοργανοποίηση είναι η πλήρης αποικοδόμηση μιας οργανικής χημικής ουσίας προς CO_2 και H_2O υπό αερόβιες συνθήκες και προς CH_4, CO_2 και H_2O υπό αναερόβιες συνθήκες.

Εγγενής βιοαποικοδομησιμότητα: Κατάταξη χημικών ουσιών για τις οποίες υπάρχουν ακλόνητες αποδείξεις βιοαποικοδόμησης (πρωτοβάθμιας ή τελικής) σε οποιαδήποτε δοκιμή βιοαποικοδομησιμότητας.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Ευκόλως βιοαποικοδομήσιμη: Αυθαίρετη κατάταξη χημικών ουσιών που έχουν επιτύχει σε συγκεκριμένες δοκιμές διαλογής για τελική βιοαποικοδομησιμότητα. Οι δοκιμές αυτές είναι τόσο αυστηρές ώστε να τεκμαίρεται ότι οι εν λόγω χημικές ουσίες βιοαποικοδομούνται ταχέως και πλήρως σε υδάτινο περιβάλλον υπό αερόβιες συνθήκες

Λανθάνουσα φάση: Ο χρόνος που μεσολαβεί από την έναρξη μιας δοκιμής έως ότου εγκλιματιστούν και/ή προσαρμοστούν οι διασπώντες μικροοργανισμοί και αυξηθεί ο βαθμός βιοαποικοδόμησης χημικής ουσίας ή οργανικής ύλης σε ανιχνεύσιμο επίπεδο (π.χ. 10 % της μέγιστης θεωρητικής βιοαποικοδόμησης ή μικρότερο ποσοστό, ανάλογα με την ακρίβεια της μεθόδου μέτρησης).

Τελική αερόβια βιοαποικοδόμηση: Ο βαθμός αποικοδόμησης που επιτυγχάνεται όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία καταναλώνεται πλήρως από μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, νερού, ανόργανων αλάτων και νέων μικροβιακών κυτταρικών συστατικών (βιομάζα).

Φάση αποικοδόμησης: Ο χρόνος που μεσολαβεί από το τέλος της λανθάνουσας περιόδου έως ότου επιτευχθεί το 90 % του μέγιστου βαθμού αποικοδόμησης.

Φάση οριζοντίωσης: Οριζοντίωση είναι η φάση κατά την οποία έχει επιτευχθεί η μέγιστη αποικοδόμηση και η καμπύλη βιοαποικοδόμησης έχει σταθεροποιηθεί.

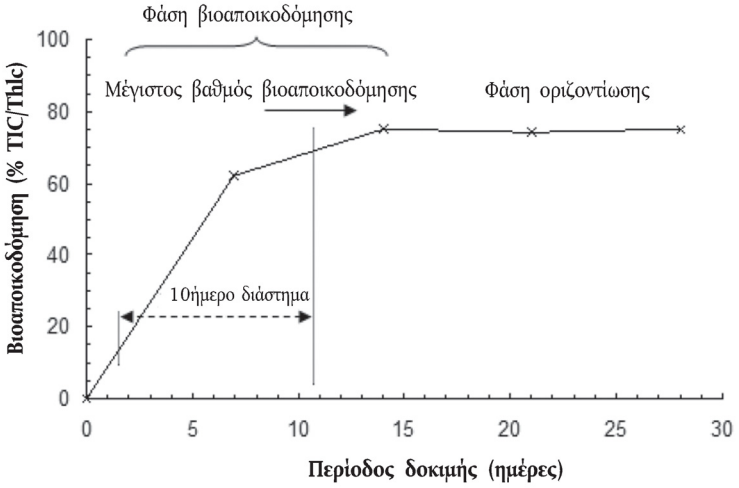
▼**M4**

Προσάρτημα 2

Παράδειγμα καμπύλης βιοαποικοδόμησης

Σχήμα 1

Βιοαποικοδόμηση οκτανόλης-1 στη δοκιμή υπερκείμενης φάσης CO_2



Γλωσσάριο

Βιοαποικοδόμηση

Φάση βιοαποικοδόμησης

Μέγιστος βαθμός βιοαποικοδόμησης

Φάση οριζοντίωσης

10ήμερο διάστημα

Περίοδος δοκιμής (ημέρες)

▼M4

Γ. 30. **ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΕ ΧΕΡΣΑΙΟΥΣ ΟΛΙΓΟΧΑΙΤΟΥΣ (OLIGOCHAETA)**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ (TG) 317 (2010). Μεταξύ των μεθόδων δοκιμών που σχετίζονται με την περιβαλλοντική συμπεριφορά, οι δοκιμές «Βιοσυγκέντρωση: Δοκιμή σε ψάρια με συνεχή ροή νερού» [κεφάλαιο Γ.13 του παρόντος παραρτήματος (49)] και «Βιοσυσσώρευση σε βενθικούς ολιγόχαιτους που διαβιούν σε ιζήματα» (53) δημοσιεύθηκαν το 1996 και το 2008 αντίστοιχα. Η παρέκταση στους χερσαίους οργανισμούς, όπως οι γαιοσκώληκες, των δεδομένων για τη βιοσυσσώρευση στους υδρόβιους οργανισμούς είναι δύσκολη, ακόμη και αδύνατη. Επί του παρόντος χρησιμοποιούνται υπολογιστικά μοντέλα που βασίζονται στη δοκιμή της λιποφιλικότητας μιας χημικής ουσίας, π.χ. (14)(37), για την εκτίμηση της βιοσυσσώρευσης των χημικών ουσιών στο έδαφος, όπως π.χ. το τεχνικό έγγραφο καθοδήγησης της ΕΕ (19). Η ανάγκη για μια μέθοδο δοκιμών ειδικά για ένα διαμέρισμα έχει ήδη αντιμετωπιστεί, π.χ. (55). Μια τέτοια μέθοδος είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αξιολόγηση της δευτερογενούς δηλητηρίασης στις χερσαίες τροφικές αλυσίδες (4). Αρκετές εθνικές μέθοδοι δοκιμών εξετάζουν το ζήτημα της βιοσυσσώρευσης σε άλλους οργανισμούς, εκτός από τα ψάρια, π.χ. (2) και (72). Μια μέθοδος για τη μέτρηση της βιοσυσσώρευσης σε γαιοσκώληκες από μολυσμένα εδάφη (Eisenia fetida, Savigny) και λευκούς σκώληκες έχει αναπτυχθεί από την Αμερικανική Εταιρεία Δοκιμών και Υλικών (ASTM) (3). Μια διεθνώς αποδεκτή μέθοδος για τον προσδιορισμό της βιοσυσσώρευσης σε εμβολιασμένο έδαφος θα βελτιώσει την εκτίμηση των κινδύνων στους οποίους εκθέτουν οι χημικές ουσίες τα χερσαία οικοσυστήματα, π.χ. (25)(29).

2. Τα ασπόνδυλα που τρέφονται από το έδαφος εκτίθενται σε χημικές ουσίες του εδάφους. Μεταξύ των ζώων αυτών, οι χερσαίοι ολιγόχαιτοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία των εδαφών (15)(20). Οι χερσαίοι ολιγόχαιτοι ζουν στο έδαφος και εν μέρει στην επιφάνειά του (ιδίως στον ξηροτάπητα). Είναι συχνά ένα από τα είδη με τη μεγαλύτερη αφθονία από άποψη βιομάζας (54). Με τη βιοανάδευση (bioturbation) του εδάφους και λειτουργώντας ως λεία, τα ζώα αυτά μπορούν να ασκούν ισχυρή επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα των χημικών ουσιών για άλλους οργανισμούς, όπως τα ασπόνδυλα [π.χ. θηρευτικά ακάρεα και σκαθάρια, π.χ. (64)] ή τα θηρευτικά σπονδυλωτά (π.χ. αλεπούδες και γλάροι) (18)(62). Ορισμένα είδη χερσαίων ολιγόχαιτων που χρησιμοποιούνται σήμερα σε οικοτοξικολογικές δοκιμές περιγράφονται στο προσάρτημα 5.

3. Ο πρότυπος οδηγός της ASTM για τη διεξαγωγή εργαστηριακών δοκιμών εδαφικής τοξικότητας ή βιοσυσσώρευσης σε γαιοσκώληκες Eisenia fetida της οικογένειας Lumbricidae και λευκούς σκώληκες Enchytraeus albidus της οικογένειας Enchytraeidae (3), παρέχει πολλά βασικά και χρήσιμα στοιχεία για την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου δοκιμών εδαφικής βιοσυσσώρευσης. Άλλα έγγραφα που αναφέρονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι το κεφάλαιο Γ.13 του παρόντος παραρτήματος «Βιοσυγκέντρωση: Δοκιμή σε ψάρια με συνεχή ροή νερού» (49) και η κατευθυντήρια γραμμή TG 315 του ΟΟΣΑ «Βιοσυσσώρευση σε βενθικούς ολιγόχαιτους που διαβιούν σε ιζήματα» (53). Η πρακτική εμπειρία από μελέτες εδαφικής βιοσυσσώρευσης και οι δημοσιεύσεις στη βιβλιογραφία, π.χ. (1)(5)(11)(12)(28)(40)(43)(45)(57)(59)(76)(78)(79), αποτελούν επίσης σημαντικές πηγές πληροφοριών για την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

4. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται ως επί το πλείστον σε σταθερές, ουδέτερες οργανικές χημικές ουσίες, οι οποίες έχουν την τάση να προσροφώνται σε εδάφη. Με την παρούσα μέθοδο είναι δυνατή η διεξαγωγή δοκιμών για βιοσυσσώρευση σταθερών οργανομεταλλικών ενώσεων που συνδέονται με το έδαφος. Επίσης, η μέθοδος εφαρμόζεται σε μέταλλα και άλλα ιχνοστοιχεία.

ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΗ

5. Δοκιμές για τη μέτρηση της βιοσυσσώρευσης μιας χημικής ουσίας σε χερσαίους ολιγόχαιτους έχουν διεξαχθεί με βαρέα μέταλλα [βλέπε π.χ. (63)] και έμμονες οργανικές χημικές ουσίες που έχουν τιμές log Kow μεταξύ 3,0 και 6,0, π.χ. (40). Οι δοκιμές αυτές ισχύουν επίσης για:

— χημικές ουσίες που παρουσιάζουν log K_{ow} άνω του 6,0 (υπερυδρόφοβες χημικές ουσίες),

▼M4

— χημικές ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των οργανικών χημικών ουσιών με γνωστό δυναμικό βιοσυσσώρευσης σε ζωντανούς οργανισμούς, π.χ. επιφανειοδραστικές ή εξαιρετικά προσροφητικές χημικές ουσίες,

— χημικές ουσίες των οποίων τα δομικά χαρακτηριστικά αποτελούν ένδειξη δυναμικού βιοσυσσώρευσης, π.χ. ανάλογες με χημικές ουσίες με γνωστό δυναμικό βιοσυσσώρευσης, και

— μέταλλα.

6. Πριν από την έναρξη της μελέτης θα πρέπει να λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη χημική ουσία, όπως η κοινή ονομασία, η χημική ονομασία (κατά προτίμηση κατά IUPAC), ο συντακτικός τύπος, ο αριθμός CAS, η καθαρότητα, οι προφυλάξεις ασφαλείας, οι κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης και οι μέθοδοι ανάλυσης. Επιπλέον, πρέπει να είναι γνωστές οι ακόλουθες πληροφορίες:

α) υδατοδιαλυτότητα,

β) συντελεστής κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-νερού, K_{ow},

γ) συντελεστής κατανομής σε έδαφος/στα ύδατα, εκφρασμένος ως K_{oc},

δ) τάση ατμών,

ε) αποικοδομησιμότητα (π.χ. στο έδαφος, στα ύδατα),

στ) γνωστοί μεταβολίτες.

7. Μπορούν να χρησιμοποιούνται ραδιοσημασμένες ή μη ραδιοσημασμένες ελεγχόμενες χημικές ουσίες. Ωστόσο, για να διευκολύνεται η ανάλυση, συνιστάται η χρήση ραδιοσημασμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Η απόφαση λαμβάνεται με βάση είτε τα όρια ανίχνευσης είτε την ανάγκη μέτρησης της μητρικής χημικής ουσίας και των μεταβολιτών. Εάν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία και μετρώνται τα συνολικά ραδιενεργά κατάλοιπα, είναι σημαντικό τα ραδιοσημασμένα κατάλοιπα, τόσο στο έδαφος όσο και στους οργανισμούς δοκιμής, να χαρακτηρίζονται ως προς τα ποσοστά της μητρικής ελεγχόμενης χημικής ουσίας και να επισημαίνονται ως μη μητρικά, π.χ. σε δείγματα που λαμβάνονται σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης, για να καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός συντελεστή βιοσυσσώρευσης (BAF) για τη μητρική ελεγχόμενη χημική ουσία και τους μεταβολίτες στο έδαφος που ενδιαφέρουν (βλέπε παράγραφο 50). Η μέθοδος που περιγράφεται στο παρόν κεφάλαιο ενδέχεται να πρέπει να τροποποιηθεί, π.χ., ώστε να παρέχει επαρκή βιομάζα, για τη μέτρηση μη ραδιοσημασμένων οργανικών ελεγχόμενων χημικών ουσιών ή μετάλλων. Όταν μετρώνται τα ολικά ραδιενεργά κατάλοιπα (με καταμέτρηση υγρού σπινθηρισμού μετά από εκχύλιση, καύση ή διαλυτοποίηση των ιστών), ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης βασίζεται στη μητρική ελεγχόμενη χημική ουσία και στους μεταβολίτες. Ο υπολογισμός του BAF θα πρέπει κατά προτίμηση να βασίζεται στη συγκέντρωση της μητρικής χημικής ουσίας στους οργανισμούς και τα ολικά ραδιενεργά κατάλοιπα. Στη συνέχεια, για λόγους συγκρισιμότητας μεταξύ των αποτελεσμάτων από διαφορετικές δοκιμές βιοσυσσώρευσης, θα πρέπει να υπολογίζεται από τον BAF ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-έδαφος (BSAF), κανονικοποιημένος ως προς το λιπιδικό περιεχόμενο των σκωλήκων και την περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανικό άνθρακα (OC).

8. Η τοξικότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή θα πρέπει να είναι γνωστή, π.χ. συγκέντρωση επίδρασης (ECx) ή θανατηφόρος συγκέντρωση (LCx) για το χρονικό διάστημα της φάσης πρόσληψης [π.χ. (19)]. Η επιλεγόμενη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει κατά προτίμηση να είναι περίπου το 1 % της οξείας ασυμπτωτικής τιμής LC_{50} και τουλάχιστον δεκαπλάσια του ορίου ανίχνευσής της στο έδαφος με τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο. Θα πρέπει να προτιμώνται, εάν υπάρχουν, οι τιμές τοξικότητας, που προέρχονται από μακροχρόνιες μελέτες με υποθανατηφόρα καταληκτικά σημεία (51)(52). Εάν τα στοιχεία αυτά δεν είναι διαθέσιμα, χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να προκύψουν από δοκιμή οξείας τοξικότητας [βλέπε π.χ. (23)].

▼M4

9. Θα πρέπει να υπάρχουν κατάλληλη αναλυτική μέθοδος, γνωστής ορθότητας (accuracy), ακρίβειας (precision) και ευαισθησίας, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής ουσίας στα διαλύματα δοκιμής, στο έδαφος και σε βιολογικό υλικό, καθώς και λεπτομερείς πληροφορίες για την παρασκευή και την αποθήκευση του δείγματος, αλλά και δελτία δεδομένων ασφάλειας υλικών. Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστά τα αναλυτικά όρια ανίχνευσης του υπό δοκιμή στοιχείου στο έδαφος όσο και στους ιστούς των σκωλήκων. Εάν χρησιμοποιείται σημασμένη με ^{14}C ελεγχόμενη χημική ουσία, θα πρέπει να είναι γνωστή η ειδική ραδιενέργεια (δηλαδή Bq mol^{-1}) και το ποσοστό της ραδιενέργειας που συνδέεται με προσμείξεις. Η ειδική ραδιενέργεια της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλή για να διευκολύνεται η ανάλυση, ενώ οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής δεν θα πρέπει να προκαλούν την εκδήλωση τοξικών επιδράσεων.

10. Η δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί με τεχνητό έδαφος ή με φυσικά εδάφη. Θα πρέπει να είναι γνωστές πριν από την έναρξη της δοκιμής πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά του χρησιμοποιούμενου φυσικού εδάφους, όπως η προέλευση ή τα συστατικά του, το pH, η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, η κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου) και η υδατοχωρητικότητα (WHC) (3)(48).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν τη βιοσυσσώρευση μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι, μεταξύ άλλων, ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης (BAF), η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης (k_s) και η σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e). Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

12. Η δοκιμή αποτελείται από δύο φάσεις: τη φάση πρόσληψης (έκθεση) και τη φάση αποβολής (μετά την έκθεση). Κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, πολλαπλές ομάδες σκωλήκων εκτίθενται σε έδαφος το οποίο έχει εμβολιαστεί με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Εκτός από τα ζώα δοκιμής, ομάδες σκωλήκων διατηρούνται ως μάρτυρες υπό πανομοιότυπες συνθήκες, χωρίς την ελεγχόμενη χημική ουσία. Μετράται το ξηρό βάρος και το λιπιδικό περιεχόμενο των οργανισμών δοκιμής. Για τον σκοπό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν σκώληκες της ομάδας-μάρτυρα. Μπορούν να ληφθούν αναλυτικές τιμές υποβάθρου (τυφλό πείραμα) με την ανάλυση δειγμάτων από τους σκώληκες-μάρτυρες και το έδαφος-μάρτυρα. Για τη φάση αποβολής οι σκώληκες μεταφέρονται σε έδαφος απαλλαγμένο από την ελεγχόμενη χημική ουσία. Η φάση αποβολής είναι πάντα υποχρεωτική, εκτός εάν η πρόσληψη της ελεγχόμενης χημικής ουσίας κατά τη διάρκεια της φάσης έκθεσης ήταν ασήμαντη. Η φάση αποβολής παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ταχύτητα με την οποία η ελεγχόμενη χημική ουσία απεκκρίνεται από τους οργανισμούς δοκιμής [π.χ. (27)]. Εάν κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης δεν επιτευχθεί σταθερή κατάσταση, ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων - συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης BAFk, σταθερές ταχύτητας πρόσληψης και αποβολής - θα πρέπει κατά προτίμηση να βασίζεται σε ταυτόχρονη προσαρμογή των αποτελεσμάτων των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια των σκωλήκων παρακολουθείται καθ' όλη τη διάρκεια και των δύο φάσεων της δοκιμής.

13. Κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, εκτελούνται μετρήσεις σε χρόνους δειγματοληψίας μέγιστης διάρκειας 14 ημερών (Enchytraeidae) ή 21 ημερών (γαιοσκώληκες), έως ότου επιτευχθεί σταθερή κατάσταση (11)(12)(67). Σταθερή κατάσταση επικρατεί όταν η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης στους σκώληκες συναρτήσει του χρόνου είναι παράλληλη προς τον άξονα του χρόνου και τρεις διαδοχικές αναλύσεις συγκέντρωσης σε δείγματα που ελήφθησαν κατά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών δεν διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερο από ± 20 % με βάση στατιστικές συγκρίσεις (π.χ., ανάλυση μεταβλητότητας, ανάλυση παλινδρόμησης).

14. Η φάση αποβολής συνίσταται στη μεταφορά των οργανισμών δοκιμής σε δοχεία που περιέχουν το ίδιο υπόστρωμα, χωρίς την ελεγχόμενη χημική ουσία. Κατά τη φάση αποβολής, εκτελούνται μετρήσεις σε χρόνους δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια 14 ημερών (Enchytraeidae) ή 21 ημερών (γαιοσκώληκες), εκτός εάν προγενέστερος αναλυτικός προσδιορισμός έδειξε μείωση κατά 90 % των υπολειμμάτων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους σκώληκες. Η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους

▼M4

σκώληκες στο τέλος της φάσης αποβολής αναφέρεται ως μη αποβληθέντα υπολείμματα. Ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης σταθερής κατάστασης (BAFss) υπολογίζεται, κατά προτίμηση, τόσο ως ο λόγος των συγκεντρώσεων στους σκώληκες (Ca) και στο έδαφος (Cs) σε φαινόμενη σταθερή κατάσταση, όσο και ως συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης, BAFK, ως ο λόγος της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης από το έδαφος (ks) προς τη σταθερά ταχύτητας αποβολής (ke) (βλέπε ορισμούς στο προσάρτημα 1), με την παραδοχή ότι η κινητική είναι πρώτης τάξης (βλέπε υπολογισμούς στο προσάρτημα 2). Εάν είναι προφανές ότι η κινητική δεν είναι πρώτης τάξης, πρέπει να χρησιμοποιούνται άλλα μοντέλα.

15. Η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης, η σταθερά ταχύτητας αποβολής (ή οι σταθερές, όταν υπεισέρχονται άλλα μοντέλα), ο συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAFK), και όπου είναι δυνατόν, τα όρια εμπιστοσύνης καθεμίας από τις παραμέτρους αυτές υπολογίζονται με υπολογιστικά μοντέλα εξισώσεων (βλέπε καθοδήγηση στο προσάρτημα 2). Η ποιότητα της προσαρμογής κάθε μοντέλου μπορεί να διαπιστωθεί, π.χ., από τον συντελεστή συσχέτισης ή τον συντελεστή προσδιορισμού (συντελεστές που προσεγγίζουν τη μονάδα δηλώνουν καλή προσαρμογή) ή με δοκιμασία «χι- τετράγωνο». Επίσης, το μέγεθος της τυπικής απόκλισης ή του ορίου εμπιστοσύνης γύρω από τις εκτιμώμενες παραμέτρους μπορεί να είναι ενδεικτικό καλής προσαρμογής του μοντέλου.

16. Για να μειωθεί η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμών στην περίπτωση ελεγχόμενων χημικών ουσιών με υψηλή λιποφιλία, οι συντελεστές βιοσυσσώρευσης θα πρέπει να εκφράζονται σε σχέση με το λιπιδικό περιεχόμενο και την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (kg οργανικού άνθρακα του εδάφους (OC) kg^{-1} λιπιδικού περιεχομένου του σκώληκα). Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι για ορισμένες κατηγορίες χημικών ουσιών υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ του δυναμικού βιοσυσσώρευσης και της λιποφιλίας, σχέση που έχει τεκμηριωθεί για τα ψάρια (47). Υπάρχει σχέση μεταξύ του λιπιδικού περιεχομένου των ψαριών και της βιοσυσσώρευσης των εν λόγω χημικών ουσιών. Για τους βενθικούς οργανισμούς, έχουν διαπιστωθεί παρόμοιες συσχετίσεις π.χ. (30)(44). Ομοίως, η συσχέτιση αυτή έχει καταδειχθεί για τους χερσαίους ολιγόχαιτους, π.χ. (5)(6)(7)(14). Εάν είναι διαθέσιμος επαρκής ιστός σκωλήκων, το λιπιδικό περιεχόμενο των ζώων δοκιμής μπορεί να προσδιοριστεί στο ίδιο βιολογικό υλικό με αυτό που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιούνται ζώα-μάρτυρες για τη μέτρηση του λιπιδικού περιεχομένου.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

17. Για να είναι έγκυρη μια δοκιμή πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια για τους μάρτυρες και τις ομάδες αγωγής:

— Στο τέλος της δοκιμής, η συνολική θνησιμότητα κατά τις φάσεις πρόσληψης και αποβολής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10 % (γαιοσκώληκες) ή το 20 % (Enchytraeidae) του συνολικού αριθμού των σκωλήκων που εισήχθησαν στη δοκιμή.

— Για τα είδη *Eisenia fetida* και *Eisenia andrei*, η μέση απώλεια μάζας, μετρούμενη στο τέλος της φάσης πρόσληψης και στο τέλος της φάσης αποβολής, δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % σε σύγκριση με το αρχικό υγρό βάρος (f.w.) κατά την έναρξη κάθε φάσης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Είδη δοκιμής

18. Για τη δοκιμή βιοσυσσώρευσης συνιστώνται διάφορα είδη χερσαίων ολιγόχαιτων. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα είδη, *Eisenia fetida* και *Eisenia andrei* (Lumbricidae), ή *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* και *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae) περιγράφονται στο προσάρτημα 5.

▼M4

Εξοπλισμός

19. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να μη χρησιμοποιούνται, σε οποιοδήποτε τμήμα του εξοπλισμού, υλικά που μπορούν να διαλύσουν ή να προσροφήσουν την ελεγχόμενη χημική ουσία ή να αποπλύνουν άλλες χημικές ουσίες και να έχουν δυσμενή επίδραση στα ζώα δοκιμής. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθη ορθογώνια ή κυλινδρικά δοχεία, κατασκευασμένα από χημικώς αδρανές υλικό και με κατάλληλη χωρητικότητα ανάλογα με τον βαθμό φόρτισης, δηλαδή των αριθμό των σκωλήκων δοκιμής. Για τον εξοπλισμό που έρχεται σε επαφή με τα μέσα της δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιείται ανοξείδωτος χάλυβας, πλαστικό ή γυαλί. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να καλύπτονται κατάλληλα για την αποτροπή της απόδρασης των σκωλήκων, ενώ ταυτόχρονα θα πρέπει να εξασφαλίζεται επαρκής αερισμός. Για τις χημικές ουσίες με υψηλούς συντελεστές προσρόφησης, όπως τα συνθετικά πυρεθροειδή, μπορεί να απαιτείται η χρήση σιλανιωμένου γυαλιού. Στις περιπτώσεις αυτές ο εξοπλισμός πρέπει να απορρίπτεται μετά τη χρήση (49). Θα πρέπει να αποτρέπεται η διαφυγή των ραδιοσημασμένων στοιχείων της δοκιμής και των πτητικών χημικών ουσιών. Για τη συγκράτηση τυχόν υπολειμμάτων που εξατμίζονται από τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παγίδες (π.χ. γυάλινες φιάλες πλύσης αερίου) που περιέχουν κατάλληλα απορροφητικά υλικά.

Έδαφος

20. Το έδαφος δοκιμής πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε οι οργανισμοί δοκιμής να μπορούν να επιβιώνουν και, κατά προτίμηση, να αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια του εγκλιματισμού και της δοκιμής, χωρίς να παρουσιάζουν ανώμαλη εμφάνιση ή συμπεριφορά. Οι σκώληκες πρέπει να φωλιάζουν στο έδαφος.

21. Συνιστάται να χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τις δοκιμές το τεχνητό έδαφος που περιγράφεται στο κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος (48). Η προετοιμασία του τεχνητού εδάφους για χρήση στις δοκιμές βιοσυσσώρευσης, περιγράφεται στο προσάρτημα 4, το οποίο περιλαμβάνει και συστάσεις για την αποθήκευσή του. Το αερόξηρο τεχνητό έδαφος μπορεί να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση.

22. Ωστόσο, φυσικά εδάφη που προέρχονται από μη ρυπασμένες τοποθεσίες μπορούν να χρησιμεύσουν ως έδαφος δοκιμής και/ή καλλιέργειας. Τα φυσικά εδάφη θα πρέπει να χαρακτηρίζονται τουλάχιστον από την προέλευση (τόπος συλλογής), το pH, την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, την κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), τη μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHCmax) και το ποσοστό υγρασίας (3). Η ανάλυση του εδάφους ή των συστατικών του για παρουσία μικρορύπων πριν από τη χρήση παρέχει χρήσιμες πληροφορίες. Εάν χρησιμοποιείται έδαφος από γεωργική έκταση, δεν θα πρέπει να έχει υποστεί κατεργασία με φυτοπροστατευτικά προϊόντα ή κοπριά ζώων που έχουν υποβληθεί σε αγωγή ως λίπασμα, για τουλάχιστον ένα έτος, και με οργανικά λιπάσματα, για τουλάχιστον έξι μήνες πριν από τη δειγματοληψία (50). Οι διαδικασίες χειρισμού του φυσικού εδάφους πριν από τη χρήση σε οικοτοξικολογικές δοκιμές με ολιγόχαιτους στο εργαστήριο περιγράφονται στη βιβλιογραφική αναφορά (3). Ο χρόνος αποθήκευσης των φυσικών εδαφών στο εργαστήριο πρέπει να είναι ο ελάχιστος δυνατός.

Εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

23. Η ελεγχόμενη χημική ουσία ενσωματώνεται στο έδαφος. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Μια υδατοδιαλυτή ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να διαλύεται πλήρως σε νερό πριν αναμειχθεί με το έδαφος. Η συνιστώμενη διαδικασία εμβολιασμού για δυσδιάλυτες στο νερό ελεγχόμενες χημικές ουσίες περιλαμβάνει την επίστρωση ενός ή περισσοτέρων από τα συστατικά του (τεχνητού) εδάφους με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Για παράδειγμα, η χαλαζιακή άμμος ή τμήμα της μπορεί να εμποτιστεί με διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη, ο οποίος στη συνέχεια εξατμίζεται αργά μέχρι ξηρού. Το επιστρωμένο κλάσμα μπορεί στη συνέχεια να αναμειχθεί με το υγρό έδαφος. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι ότι δεν εισάγεται διαλύτης στο έδαφος. Όταν χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος, η ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να προστεθεί με εμβολιασμό ενός αερόξηρου τμήματος του εδάφους, όπως περιγράφεται

▼M4

ανωτέρω για το τεχνητό έδαφος, ή με ανάδευση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσα στο υγρό έδαφος, με επακόλουθη εξάτμιση, εάν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης. Γενικά, θα πρέπει να αποφεύγεται όσο το δυνατόν περισσότερο η επαφή του υγρού εδάφους με διαλύτες. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα (3):

— Εάν χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης εκτός από το νερό, αυτός θα πρέπει να είναι αναμείξιμος με το νερό και/ή να μπορεί να απομακρυνθεί (για παράδειγμα, να εξατμιστεί), αφήνοντας στο έδαφος μόνο την ελεγχόμενη χημική ουσία.

— Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης-μάρτυρας, δεν χρειάζεται αρνητικός μάρτυρας. Ο διαλύτης-μάρτυρας θα πρέπει να περιέχει την υψηλότερη από τις συγκεντρώσεις διαλύτη που προστίθενται στο έδαφος και να παρασκευάζεται με διαλύτη από την ίδια παρτίδα με εκείνη που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης. Τα βασικά κριτήρια για την επιλογή κατάλληλου μέσου διαλυτοποίησης πρέπει να είναι η τοξικότητα και η πτητικότητα του διαλύτη, καθώς και η διαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον επιλεγμένο διαλύτη.

24. Για χημικές ουσίες που είναι δυσδιάλυτες στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, μπορούν να αναμειγνύονται 2,0-2,5 g λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής με την ποσότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, π.χ. με τη χρήση υγδίου με ύπερο, για να ληφθεί η επιθυμητή συγκέντρωση δοκιμής. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και ελεγχόμενης χημικής ουσίας προστίθεται στο έδαφος, που έχει προηγουμένως υγρανθεί, και αναμειγνύεται πλήρως με κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού για να ληφθεί η απαιτούμενη περιεκτικότητα σε υγρασία. Το τελικό μείγμα κατανέμεται στα δοχεία δοκιμής. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και παρασκευάζεται επίσης ένας κατάλληλος μάρτυρας με 2,0-2,5 g λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής.

25. Μετά τον εμβολιασμό θα πρέπει να προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος και, πριν από την εισαγωγή των οργανισμών δοκιμής, θα πρέπει να ελέγχεται η ομοιογενής κατανομή της στο έδαφος. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό, καθώς και οι λόγοι για την επιλογή μιας συγκεκριμένης διαδικασίας εμβολιασμού πρέπει να αναφέρονται (24).

26. Στην ιδανική περίπτωση, θα πρέπει να επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ του εδάφους και του ενδοπορικού νερού πριν από την προσθήκη των οργανισμών. Συνιστάται χρονικό διάστημα τεσσάρων ημερών στους 20 °C. Για πολλές δυσδιάλυτες στο νερό οργανικές χημικές ουσίες, ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί πραγματική ισορροπία μεταξύ των προσροφημένων και των διαλυμένων τμημάτων μπορεί να είναι ημέρες ή μήνες. Ανάλογα με τον σκοπό της μελέτης, για παράδειγμα όταν πρέπει να προσομοιώνονται περιβαλλοντικές συνθήκες, το εμβολιασμένο έδαφος μπορεί να «παλαιώνεται» για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, π.χ. τρεις εβδομάδες στους 20 °C για τα μέταλλα (22).

Καλλιέργεια των οργανισμών δοκιμής

27. Οι σκώληκες θα πρέπει, κατά προτίμηση, να διατηρούνται σε μόνιμη εργαστηριακή καλλιέργεια. Καθοδήγηση σχετικά με τις μεθόδους εργαστηριακής καλλιέργειας των ειδών Eisenia fetida και Eisenia andrei και των ειδών της οικογένειας Enchytraeidae παρέχεται στο προσάρτημα 5 [βλέπε επίσης (48)(51)(52)].

28. Οι σκώληκες που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές πρέπει να είναι απαλλαγμένοι από παρατηρήσιμες νόσους, ανωμαλίες και παράσιτα.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

29. Οι οργανισμοί δοκιμής εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία κατά τη φάση πρόσληψης, η οποία θα πρέπει να διαρκεί 14 ημέρες (Enchytraeidae) ή 21 ημέρες (γαιοσκώληκες), εκτός εάν καταδεικνύεται ότι έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση.

▼M4

30. Για τη φάση αποβολής οι σκώληκες μεταφέρονται σε έδαφος που δεν περιέχει την ελεγχόμενη χημική ουσία. Το πρώτο δείγμα πρέπει να λαμβάνεται εντός 4-24 ωρών από την έναρξη της φάσης αποβολής. Παραδείγματα προγραμμάτων δειγματοληψίας για μια 21ήμερη φάση πρόσληψης και μια 21ήμερη φάση αποβολής παρατίθενται στο προσάρτημα 3.

Οργανισμοί δοκιμής

31. Για πολλά είδη χερσαίων λευκών σκωλήκων (Enchytraeidae) το βάρος σώματος είναι πολύ μικρό (π.χ. 5-10 mg υγρού βάρους ανά άτομο για το είδος Enchytraeus albidus και λιγότερο για τα είδη *Enchytraeus crypticus* και *Enchytraeus luxuriosus*). Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις βάρους και η χημική ανάλυση, μπορεί να είναι απαραίτητη η συνένωση των σκωλήκων των πολλαπλών δοχείων (δηλαδή όλοι οι σκώληκες ενός από τα πολλαπλά δοχεία θα χρησιμοποιηθούν για τη λήψη ενός αναλυτικού αποτελέσματος ιστών). Σε καθένα από τα πολλαπλά δοχεία προστίθενται 20 άτομα Enchytraeus, ενώ πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία δοχεία πολλαπλού προσδιορισμού. Εάν το αναλυτικό όριο ανίχνευσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι υψηλό, ενδέχεται να απαιτούνται περισσότεροι σκώληκες. Για τα είδη δοκιμής με μεγαλύτερο βάρος σώματος (*Eisenia fetida* και *Eisenia andrei*), μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλαπλά δοχεία τα οποία περιέχουν ένα άτομο.

32. Οι γαιοσκώληκες που χρησιμοποιούνται σε μια δοκιμή θα πρέπει να έχουν παρόμοιο βάρος (π.χ. τα *Eisenia fetida* και *Eisenia andrei* θα πρέπει να έχουν βάρος 250-600 mg κατ' άτομο). Τα Enchytraeus (π.χ. *Enchytraeus albidu*) θα πρέπει να έχουν μήκος περίπου 1 cm. Όλοι οι σκώληκες που χρησιμοποιούνται σε μια συγκεκριμένη δοκιμή θα πρέπει να προέρχονται από την ίδια πηγή και να είναι ενήλικα ζώα με δακτυλιοειδή τμήματα (βλέπε προσάρτημα 5). Δεδομένου ότι το βάρος και η ηλικία του ζώου μπορεί να έχουν επίδραση στις τιμές BAF (π.χ. λόγω διαφορετικού λιπιδικού περιεχομένου και/ή της παρουσίας αυγών), οι παράμετροι αυτές θα πρέπει να καταγράφονται με ακρίβεια και να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, είναι δυνατόν να αποτίθενται κουκούλια κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, πράγμα που επηρεάζει επίσης τις τιμές BAF. Συνιστάται να ζυγίζεται, πριν από τη δοκιμή, ένα επιμέρους δείγμα των σκωλήκων δοκιμής για την εκτίμηση του μέσου υγρού και ξηρού βάρους.

33. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται υψηλή αναλογία εδάφους/σκωλήκων προκειμένου να ελαχιστοποιείται η μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης. Για τα είδη *Eisenia fetida* και *Eisenia andrei* συνιστάται ελάχιστη ποσότητα 50 g ξηρού βάρους (d.w.) εδάφους ανά σκώληκα και, για τα Enchytraeus, τουλάχιστον 10-20 g ξηρού βάρους εδάφους ανά δοχείο δοκιμής. Τα δοχεία θα πρέπει να περιέχουν ένα στρώμα εδάφους 2-3 cm (Enchytraeidae) ή 4-5 cm (γαιοσκώληκες).

34. Οι σκώληκες που χρησιμοποιούνται σε μια δοκιμή απομακρύνονται από την καλλιέργεια (π.χ. τα Enchytraeus με λαβίδες). Τα ενήλικα ζώα μεταφέρονται σε μη κατεργασμένο έδαφος δοκιμής για εγκλιματισμό και σιτίζονται (βλέπε παράγραφο 36). Εάν οι συνθήκες δοκιμής διαφέρουν από τις συνθήκες καλλιέργειας, μια φάση εγκλιματισμού διάρκειας 24-72 ωρών θα πρέπει να είναι επαρκής προκειμένου να προσαρμοστούν οι σκώληκες στις συνθήκες δοκιμής. Μετά τον εγκλιματισμό, οι γαιοσκώληκες εκπλύνονται με μεταφορά σε γυάλινα τριβλία (π.χ. τριβλία Petri) που περιέχουν καθαρό νερό και, στη συνέχεια, ζυγίζονται πριν προστεθούν στο έδαφος δοκιμής. Πριν από τη ζύγιση, θα πρέπει να απομακρύνεται η περίσσεια νερού από τους σκώληκες, με ελαφρά επαφή με το άκρο του τριβλίου ή στέγνωμα με τη βοήθεια ελαφρώς βρεγμένου απορροφητικού χαρτιού.

35. Η συμπεριφορά που επιδεικνύουν οι οργανισμοί δοκιμής όσον αφορά το φώλιασμα θα πρέπει να παρατηρείται και να καταγράφεται. Σε δοκιμές με γαιοσκώληκες τα ζώα (μάρτυρες και ομάδες αγωγής) συνήθως φωλιάζουν στο έδαφος εντός μερικών ωρών. Αυτό θα πρέπει να ελέγχεται το αργότερο 24 ώρες μετά την προσθήκη των σκωλήκων στα δοχεία δοκιμής. Εάν οι γαιοσκώληκες δεν φωλιάσουν στο έδαφος (π.χ. ποσοστό άνω του 10 % αφού παρέλθει περισσότερο από το ήμισυ της φάσης πρόσληψης), αυτό

▼M4

δηλώνει ότι είτε οι συνθήκες δοκιμής δεν είναι κατάλληλες είτε οι οργανισμοί δοκιμής δεν είναι υγιείς. Σε μια τέτοια περίπτωση η δοκιμή θα πρέπει να διακοπεί και να επαναληφθεί. Τα Enchytraeus ζουν κυρίως στους διάμεσους πόρους του εδάφους και συχνά η περιδερμίδα τους μπορεί να έρχεται μόνο εν μέρει σε επαφή με το περιβάλλον υπόστρωμα. Η έκθεση των Enchytraeus που φωλιάζουν και όσων δεν φωλιάζουν υποτίθεται ότι είναι ισοδύναμη και η απουσία φωλιάσματος δεν συνεπάγεται κατ' ανάγκη την επανάληψη της δοκιμής.

Διατροφή

36. Θα πρέπει να προβλέπεται χορήγηση τροφής στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται έδαφος με χαμηλή περιεκτικότητα σε ολικό οργανικό άνθρακα. Όταν χρησιμοποιείται τεχνητό έδαφος, συνιστάται εβδομαδιαία χορήγηση τροφής (δηλαδή οι σκώληκες θα πρέπει να τρέφονται μία φορά ανά εβδομάδα), αποτελούμενης από 7 mg αποξηραμένης κοπριάς ανά g ξηρού βάρους εδάφους, για τους γαιοσκώληκες, και από 2-2,5 mg νιφάδων βρώμης ανά g ξηρού βάρους εδάφους για τα Enchytraeus (11). Το πρώτο σιτηρέσιο θα πρέπει να αναμειγνύεται με το έδαφος αμέσως πριν προστεθούν οι οργανισμοί δοκιμής. Κατά προτίμηση, πρέπει να χρησιμοποιείται το ίδιο είδος τροφής όπως στις καλλιέργειες (βλέπε προσάρτημα 5).

Φως και θερμοκρασία

37. Οι δοκιμές πρέπει να διεξάγονται υπό ελεγχόμενο κύκλο φωτός/σκοταδιού 16/8 ωρών, κατά προτίμηση με φωτεινή ισχύ 400 έως 800 lx στην περιοχή των δοχείων δοκιμής (3). Η θερμοκρασία δοκιμής θα πρέπει να είναι 20 ± 2 °C καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκεντρώσεις δοκιμής

38. Χρησιμοποιείται μία και μόνο συγκέντρωση. Οι περιπτώσεις στις οποίες απαιτούνται μία ή περισσότερες πρόσθετες συγκεντρώσεις θα πρέπει να αιτιολογούνται. Εάν η τοξικότητα (ECx) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας προσεγγίζει το αναλυτικό όριο ανίχνευσης, συνιστάται η χρήση ραδιοσημασμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας με υψηλή ειδική ραδιενέργεια. Για τα μέταλλα, η συγκέντρωση θα πρέπει να υπερβαίνει το επίπεδο υποβάθρου στους ιστούς και στο έδαφος.

Πολλαπλότητα

39. Για τις κινητικές μετρήσεις (φάση πρόσληψης και αποβολής), ο ελάχιστος αριθμός δοχείων που υποβάλλονται σε αγωγή πρέπει να είναι τρία ανά σημείο δειγματοληψίας. Ο συνολικός αριθμός των πολλαπλών δοχείων θα πρέπει να είναι επαρκής για να καλύπτει όλους τους χρόνους δειγματοληψίας κατά τις φάσεις πρόσληψης και αποβολής.

40. Για τις βιολογικές παρατηρήσεις και μετρήσεις (π.χ. αναλογία ξηρού προς υγρό βάρος, λιπιδικό περιεχόμενο) και για την ανάλυση των συγκεντρώσεων υποβάθρου στους σκώληκες και το έδαφος, θα πρέπει να προβλέπονται τουλάχιστον 12 δοχεία αρνητικού μάρτυρα (δειγματοληψία από τέσσερα από τα δοχεία αυτά κατά την έναρξη της δοκιμής, από τέσσερα στο τέλος της φάσης πρόσληψης και από τέσσερα στο τέλος της φάσης αποβολής), εάν δεν χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης πλην του νερού. Εάν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης για την εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, θα πρέπει, επιπλέον των πολλαπλών δοχείων που υποβάλλονται σε αγωγή, να εκτελούνται μετρήσεις σε μάρτυρα του διαλύτη (θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα από τέσσερα δοχεία πολλαπλού προσδιορισμού κατά την έναρξη της δοκιμής, από τέσσερα στο τέλος της φάσης πρόσληψης και από τέσσερα κατά το τέλος της φάσης αποβολής), που περιέχει όλα τα συστατικά εκτός από το υπό δοκιμή στοιχείο. Στην περίπτωση αυτή, είναι επίσης δυνατόν να προβλέπονται τέσσερα επιπρόσθετα δοχεία αρνητικού μάρτυρα (χωρίς διαλύτη) για προαιρετική δειγματοληψία στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Τα εν λόγω πολλαπλά δοχεία μπορούν να συγκρίνονται από βιολογικής πλευράς με τον μάρτυρα του διαλύτη ώστε να συγκεντρώνονται πληροφορίες σχετικά με την ενδεχόμενη επίδραση του διαλύτη στους οργανισμούς δοκιμής. Συνιστάται η ετοιμασία επαρκούς αριθμού πρόσθετων εφεδρικών πολλαπλών δοχείων (π.χ. οκτώ) για αγωγή και ως μαρτύρων.

▼M4

Συχνότητα μετρήσεων της ποιότητας του εδάφους

41. Πρέπει να μετρώνται το pH και η υγρασία του εδάφους, καθώς και η θερμοκρασία (συνεχώς) της αίθουσας δοκιμής στην αρχή και στο τέλος των φάσεων πρόσληψης και αποβολής Μία φορά την εβδομάδα θα πρέπει να ελέγχεται η υγρασία του εδάφους με ζύγιση των δοχείων δοκιμής και σύγκριση των τρεχόντων βαρών με τα αρχικά βάρη στην αρχή της δοκιμής. Οι απώλειες νερού θα πρέπει να αναπληρώνονται με την προσθήκη απιονισμένου νερού.

Δειγματοληψία και ανάλυση σκωλήκων και εδάφους

42. Παράδειγμα χρονοδιαγράμματος για τις φάσεις πρόσληψης και αποβολής σε δοκιμές βιοσυσσώρευσης με γαιοσκώληκες και Enchytraeus παρατίθεται στο προσάρτημα 3.

43. Από τα δοχεία δοκιμής λαμβάνονται δείγματα του εδάφους για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, πριν από την εισαγωγή των σκωλήκων, καθώς και κατά τη διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Κατά τη δοκιμή προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους σκώληκες και στο έδαφος. Γενικά, μετρώνται οι συνολικές συγκεντρώσεις στο έδαφος. Εναλλακτικά, μπορούν να μετρώνται οι συγκεντρώσεις στο ενδοπορικό νερό. Σε μια τέτοια περίπτωση, η αιτιολόγηση και οι κατάλληλες μέθοδοι θα πρέπει να εξασφαλίζονται πριν από την έναρξη της μελέτης και να συμπεριλαμβάνονται στην έκθεση.

44. Από τους σκώληκες και το έδαφος λαμβάνονται δείγματα τουλάχιστον έξι φορές κατά τη διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Εάν έχει καταδειχθεί η σταθερότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας, μπορεί να μειωθεί ο αριθμός των αναλύσεων του εδάφους. Συνιστάται η ανάλυση τουλάχιστον τριών δοχείων πολλαπλού προσδιορισμού στην αρχή και στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Εάν η συγκέντρωση που μετράται στο έδαφος στο τέλος της φάσης πρόσληψης αποκλίνει από την αρχική συγκέντρωση κατά περισσότερο από 30 %, θα πρέπει να αναλύονται και τα δείγματα εδάφους που έχουν ληφθεί σε άλλες ημερομηνίες.

45. Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας αφαιρούνται οι σκώληκες του συγκεκριμένου δοχείου πολλαπλού προσδιορισμού από το έδαφος (π.χ. αφού απλωθεί το έδαφος του δοχείου σε έναν ρηχό δίσκο και συλλεγούν οι σκώληκες με τη βοήθεια μαλακών λαβίδων) και εκπλύνονται γρήγορα με νερό σε ρηχό γυάλινο ή χαλύβδινο δίσκο. Απομακρύνεται η περίσσεια νερού (βλέπε παράγραφο 34). Οι σκώληκες μεταφέρονται με προσοχή σε προζυγισμένο δοχείο και ζυγίζονται αμέσως, συμπεριλαμβανομένου του περιεχομένου του εντέρου.

46. Στη συνέχεια, οι γαιοσκώληκες (*Eisenia* sp.) θα πρέπει να αφήνονται να κενώσουν το έντερό τους στη διάρκεια της νύκτας, π.χ. πάνω σε υγρό διηθητικό χαρτί, τοποθετημένο σε τρυβλίο Petri με κάλυμμα (βλέπε παράγραφο 34). Μετά την κένωση θα πρέπει να προσδιορίζεται το βάρος των σκωλήκων προκειμένου να εκτιμάται η πιθανή μείωση της βιομάζας κατά τη διάρκεια της δοκιμής (βλέπε κριτήρια εγκυρότητας στην παράγραφο 17). Η ζύγιση και η ιστολογική ανάλυση των Enchytraeus εκτελούνται χωρίς να έχει μεσολαβήσει κένωση, καθώς αυτή είναι τεχνικά δύσκολη λόγω του μικρού μεγέθους των σκωλήκων αυτών. Μετά από τον προσδιορισμό του τελικού βάρους, οι σκώληκες θα πρέπει να θανατώνονται αμέσως, με την πλέον ενδεδειγμένη μέθοδο (π.χ. χρήση υγρού αζώτου ή κατάψυξη σε θερμοκρασίες κάτω των – 18 °C).

47. Κατά τη φάση αποβολής, οι σκώληκες αντικαθιστούν το μολυσμένο περιεχόμενο του εντέρου με καθαρό χώμα. Αυτό συνεπάγεται ότι οι μετρήσεις σε σκώληκες χωρίς να έχει μεσολαβήσει κένωση (εν προκειμένω, Enchytraeus), δείγματα των οποίων έχουν ληφθεί αμέσως πριν από τη φάση αποβολής, περιλαμβάνουν μολυσμένο έδαφος από το έντερο. Για τους υδρόβιους ολιγόχαιτους υποτίθεται ότι μετά τις πρώτες 4-24 ώρες της φάσης αποβολής, το μεγαλύτερο μέρος του μολυσμένου περιεχομένου του εντέρου έχει αντικατασταθεί από καθαρό ίζημα, π.χ. (46). Παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί για γαιοσκώληκες σε μελέτες με αντικείμενο τη συσσώρευση ραδιοσημασμένου καδμίου και ψευδαργύρου (78). Στα Enchytraeus που δεν έχουν κενώσει το έντερό τους, η συγκέντρωση σε αυτό το πρώτο δείγμα της φάσης αποβολής μπορεί να θεωρηθεί ως η συγκέντρωση στον ιστό μετά την κένωση του εντέρου. Για να ληφθεί υπόψη η αραίωση της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου από μη μολυσμένο έδαφος κατά τη φάση αποβολής, το βάρος του περιεχομένου του εντέρου μπορεί να υπολογιστεί από τον λόγο υγρού βάρους/βάρος της τέφρας του σκώληκα ή από τον λόγο ξηρού βάρους/βάρος της τέφρας του σκώληκα.

▼M4

48. Τα δείγματα εδάφους και σκωλήκων πρέπει να αναλύονται κατά προτίμηση αμέσως μετά την αφαίρεση (δηλαδή εντός 1-2 ημερών), προκειμένου να αποφεύγονται η αποικοδόμηση ή άλλες απώλειες. Συνιστάται ο υπολογισμός των κατά προσέγγιση ποσοστών πρόσληψης και αποβολής κατά την πορεία της δοκιμής. Εάν η ανάλυση καθυστερεί, τα δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται με κατάλληλη μέθοδο, π.χ. κατάψυξη (≤ – 18 °C).

49. Θα πρέπει να ελέγχεται αν η ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα της χημικής ανάλυσης, καθώς και η ανάκτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από τα δείγματα εδάφους και σκωλήκων είναι ικανοποιητικές για τη συγκεκριμένη μέθοδο. Θα πρέπει να αναφέρονται η αποδοτικότητα της εκχύλισης, το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ). Ομοίως, θα πρέπει να εξακριβώνεται ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία δεν είναι ανιχνεύσιμη στα δοχεία μάρτυρες σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τη συγκέντρωση υποβάθρου. Όταν η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον οργανισμό δοκιμής Ca είναι > 0 στους σκώληκες-μάρτυρες, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων (βλέπε προσάρτημα 2). Ο τρόπος χειρισμού όλων των δειγμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μόλυνσης και απωλειών (π.χ. λόγω προσρόφησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη συσκευή δειγματοληψίας).

50. Η χρήση ραδιοσημασμένης ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθιστά δυνατή την ανάλυση της μητρικής ουσίας και των μεταβολιτών. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της μητρικής ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των μεταβολιτών σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης παρέχει σημαντικές πληροφορίες. Τα δείγματα θα πρέπει στη συνέχεια να «καθαρίζονται», ούτως ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά η μητρική χημική ουσία χωριστά. Εάν οι μεταβολίτες υπερβαίνουν, μεμονωμένα, το 10 % της συνολικής ραδιενέργειας των αναλυόμενων δειγμάτων, συνιστάται η ταυτοποίηση των μεταβολιτών αυτών.

51. Θα πρέπει να καταγράφονται και να αναφέρονται η συνολική ανάκτηση και η ανάκτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους σκώληκες, στο έδαφος και, εφόσον έχουν χρησιμοποιηθεί, στις παγίδες που περιέχουν απορροφητικά υλικά για τη συγκράτηση ελεγχόμενων χημικών ουσιών οι οποίες εξατμίζονται.

52. Η συνένωση των ατόμων που ελήφθησαν ως δείγματα από ένα συγκεκριμένο δοχείο δοκιμής είναι αποδεκτή στην περίπτωση των σκωλήκων της οικογένειας Enchytraeidae, που είναι μικρότεροι από τους γαιοσκώληκες. Εάν η συνένωση συνεπάγεται μείωση του αριθμού των πολλαπλών μετρήσεων, η μείωση αυτή περιορίζει τις στατιστικές διαδικασίες που μπορούν να εφαρμοστούν στα δεδομένα. Εάν απαιτείται συγκεκριμένη στατιστική διαδικασία και ισχύς, θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη δοκιμή ο κατάλληλος αριθμός πολλαπλών δοχείων δοκιμής που συνάδει με την επιθυμητή συνένωση, διαδικασία και ισχύ.

53. Συνιστάται να εκφράζεται ο BAF τόσο ως συνάρτηση του συνολικού ξηρού βάρους όσο και ως συνάρτηση του λιπιδικού περιεχομένου, όταν απαιτείται (δηλαδή για εξαιρετικά υδρόφοβες χημικές ουσίες). Πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό του λιπιδικού περιεχομένου (ορισμένες από τις υφιστάμενες μεθόδους —π.χ. (31)(58)— θα πρέπει να προσαρμόζονται για τον σκοπό αυτό). Στις εν λόγω μεθόδους χρησιμοποιείται τεχνική εκχύλισης με χλωροφόρμιο/μεθανόλη. Ωστόσο, για να αποφευχθεί η χρήση χλωριωμένων διαλυτών, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια τροποποίηση της μεθόδου Bligh και Dyer (9) που περιγράφεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (17). Δεδομένου ότι οι διάφορες μέθοδοι μπορεί να μην αποδίδουν ταυτόσημα αποτελέσματα (10), έχει σημασία να αναφέρονται λεπτομερή στοιχεία για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Όταν είναι δυνατόν, δηλαδή εάν είναι διαθέσιμος επαρκής ιστός σκωλήκων, η ανάλυση των λιπιδίων θα πρέπει ιδανικά να εκτελείται στο ίδιο δείγμα ή εκχύλισμα με εκείνο που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, δεδομένου ότι τα λιπίδια πρέπει συχνά να απομακρύνονται από το εκχύλισμα ώστε να είναι δυνατή η χρωματογραφική ανάλυσή του (49). Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιούνται τα ζώα-μάρτυρες για τη μέτρηση του λιπιδικού περιεχομένου, το οποία μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για την κανονικοποίηση των τιμών BAF. Με την προσέγγιση αυτή μειώνεται η μόλυνση του εξοπλισμού από την ελεγχόμενη χημική ουσία.

▼M4

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

54. Η καμπύλη πρόσληψης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας λαμβάνεται με γραφική παράσταση, σε αριθμητικές κλίμακες, της συγκέντρωσης της ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια των σκωλήκων κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης συναρτήσει του χρόνου. Όταν η καμπύλη εμφανίζει οριζοντίωση ή σταθερή κατάσταση (βλέπε ορισμούς στο προσάρτημα 1), ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης σε σταθερή κατάσταση, BAFss, υπολογίζεται ως εξής:

$$\frac{C_a \text{ σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης (μέση τιμή)}}{C_s \text{ σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης (μέση τιμή)}}$$

C_a είναι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον οργανισμό δοκιμής

C_s είναι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος

55. Όταν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση, αντί του BAFss θα πρέπει να προσδιορίζεται ο BAF_K, με βάση τις σταθερές ταχύτητας, όπως περιγράφεται κατωτέρω:

— Προσδιορίζεται ο συντελεστής συσσώρευσης (BAF_K) ως λόγος k_s/k_e.

— Οι ταχύτητες πρόσληψης και αποβολής υπολογίζονται κατά προτίμηση ταυτόχρονα (βλέπε εξίσωση 11 στο προσάρτημα 2).

— Η σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e) προσδιορίζεται συνήθως από την καμπύλη αποβολής (δηλαδή τη γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου στους σκώληκες κατά τη φάση αποβολής). Στη συνέχεια υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης, k_s, με βάση την k_e και την τιμή C_a που προκύπτει από την καμπύλη πρόσληψης —βλέπε περιγραφή των μεθόδων αυτών στο προσάρτημα 2. Η μέθοδος που προτιμάται για τη λήψη του BAF_K και των σταθερών ταχύτητας k_s και k_e είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή. Εάν είναι προφανές ότι η αποβολή δεν είναι πρώτης τάξης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο περίπλοκα μοντέλα.

Έκθεση δοκιμής

56. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

— Κάθε διαθέσιμη πληροφορία σχετικά με την οξεία ή τη μακροχρόνια τοξικότητα (π.χ. EC_x, LC_x, NOEC) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας για τους ολιγόχαιτους που διαβιούν στο έδαφος,

— καθαρότητα, φυσική κατάσταση και φυσικοχημικές ιδιότητες, π.χ. log K_{ow}, υδατοδιαλυτότητα,

— στοιχεία ταυτότητας της χημικής ουσίας, πηγή του υπό δοκιμή στοιχείου, ταυτότητα και συγκέντρωση του διαλύτη που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε,

— εάν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη ελεγχόμενη χημική ουσία, ακριβής θέση των σημασμένων ατόμων, ειδική ραδιενέργεια και ραδιοχημική καθαρότητα.

Υπό δοκιμή είδος:

— επιστημονική ονομασία, στέλεχος, πηγή, τυχόν προηγηθείσα αγωγή, εγκλιματισμός, ηλικία, εύρος μεγεθών κ.λπ.

▼M4

Συνθήκες δοκιμής:

— εφαρμοσθείσα διαδικασία δοκιμής,

— τύπος και χαρακτηριστικά του χρησιμοποιηθέντος φωτισμού και φωτοπερίοδος(-οι),

— σχεδιασμός της δοκιμής (π.χ. αριθμός και μέγεθος των δοχείων δοκιμής, μάζα του εδάφους και ύψος του στρώματος του εδάφους, αριθμός πολλαπλών προσδιορισμών, αριθμός σκωλήκων ανά προσδιορισμό, αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής, διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής, συχνότητα δειγματοληψίας),

— αιτιολόγηση της επιλογής του υλικού του δοχείου δοκιμής,

— μέθοδος παρασκευής και εφαρμογής του υπό δοκιμή στοιχείου, καθώς και αιτιολόγηση της επιλογής μιας συγκεκριμένης μεθόδου,

— ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μέσοι όροι των τιμών που μετρήθηκαν στα δοχεία δοκιμής και οι τυπικές αποκλίσεις τους, και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν οι τιμές αυτές,

— πηγή των συστατικών του τεχνητού εδάφους ή —εάν χρησιμοποιούνται φυσικά μέσα— προέλευση του εδάφους, περιγραφή τυχόν προκατεργασίας, αποτελέσματα για τους μάρτυρες (επιβίωση, ανάπτυξη βιομάζας, αναπαραγωγή), χαρακτηριστικά του εδάφους (pH, περιεκτικότητα σε ολικό οργανικό άνθρακα, κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHC_{max}), ποσοστό υγρασίας στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής και τυχόν άλλες μετρήσεις),

— λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την κατεργασία των δειγμάτων εδάφους και σκωλήκων, μεταξύ των οποίων λεπτομέρειες για την παρασκευή, την αποθήκευση, τις διαδικασίες εμβολιασμού, την εκχύλιση και τις αναλυτικές διαδικασίες (και ακρίβεια) για το υπό δοκιμή στοιχείο στους σκώληκες και στο έδαφος και για το λιπιδικό περιεχόμενο (αν έχει μετρηθεί), και ανακτήσεις του υπό δοκιμή στοιχείου.

Αποτελέσματα:

— θνησιμότητα των σκωλήκων-μαρτύρων και των σκωλήκων κάθε δοχείου δοκιμής και τυχόν παρατηρηθείσα ανώμαλη συμπεριφορά (π.χ. αποφυγή του εδάφους, απουσία αναπαραγωγής σε δοκιμή βιοσυσσώρευσης με Enchytraeus),

— αναλογία ξηρού προς υγρό βάρος του εδάφους και των οργανισμών δοκιμής (χρήσιμη για κανονικοποίηση),

— υγρά βάρη των σκωλήκων σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας· για τους γαιοσκώληκες, υγρά βάρη κατά την έναρξη της δοκιμής και σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, πριν και μετά την κένωση του εντέρου,

— λιπιδικό περιεχόμενο των οργανισμών δοκιμής (αν έχει προσδιοριστεί),

— καμπύλες στις οποίες εμφαίνεται η κινητική πρόσληψης και αποβολής της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στους σκώληκες, καθώς και ο χρόνος μέχρι τη σταθερή κατάσταση,

— τιμές C_a και C_s (με τυπική απόκλιση και εύρος, κατά περίπτωση) για όλους τους χρόνους δειγματοληψίας (η C_a εκφράζεται σε g kg^{-1} υγρού και ξηρού βάρους ολόκληρου του σώματος, ενώ η C_s εκφράζεται σε g kg^{-1} υγρού και ξηρού βάρους εδάφους). Εάν απαιτείται ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-έδαφος (BSAF) (π.χ. για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων δύο ή περισσότερων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί σε ζώα με διαφορετικό λιπιδικό περιεχόμενο), η C_a μπορεί επιπλέον να εκφράζεται σε g kg^{-1} λιπιδικού περιεχομένου του οργανισμού και η C_s σε g kg^{-1} οργανικού άνθρακα (OC) του εδάφους,

— BAF (εκφραζόμενος σε kg·εδάφους kg^{-1} σκώληκα), σταθερά ταχύτητας πρόσληψης εδάφους k_s (εκφραζόμενη σε g εδάφους kg^{-1} σκώληκα $ημέρα^{-1}$) και σταθερά ταχύτητας αποβολής k_e (εκφραζόμενη σε $ημέρα^{-1}$)· επιπροσθέτως μπορεί να αναφέρεται ο BSAF (εκφραζόμενος σε kg OC εδάφους kg^{-1} λιπιδικού περιεχομένου σκώληκα),

▼M4

— εάν έχουν μετρηθεί: εκατοστιαίες αναλογίες της μητρικής χημικής ουσίας, των μεταβολιτών και των δεσμευμένων υπολειμμάτων (δηλαδή το ποσοστό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που δεν είναι δυνατόν να εκχυλιστεί με τις κοινές μεθόδους εκχύλισης) που ανιχνεύθηκαν στο έδαφος και στα ζώα δοκιμής,

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων:

— συμμόρφωση των αποτελεσμάτων με τα κριτήρια εγκυρότητας που αναφέρονται στην παράγραφο 17,

— μη αναμενόμενα ή ασυνήθη αποτελέσματα, π.χ. ατελής αποβολή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας από τα ζώα δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

(1) Amorim M. (2000), Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus, Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000), Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004), Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000), The assessment of bioaccumulation, στο Hutzinger O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994), The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil, *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 93-99.

(6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. και Hermens J. (1993), The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water, *Ecotox. Environ. Safety* 25: 154-165.

(7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995), Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*), *Ecotox. Environ. Safety* 31: 185-191.

(8) Bell A.W. (1958), The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus, Ann. Mus. Novitat.* 1902: 1-13.

(9) Bligh E.G. και Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Pysiol.* 37: 911-917.

(10) Bouche M. (1972), Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a), Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten, Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J. Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b), Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida), *Hydrobiologia* 463: 185-196.

(13) Conder J.M. και Lanno R.P. (2003), Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida, J. Soils Sediments* 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell D.W. και Markwell R.D. (1990), Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System, *Chemosphere* 20: 91-100.

(15) Didden W.A.M. (1993), Ecology of Terrestrial Enchytraeidae, *Pedobiologia* 37: 2-29.

(16) Didden W. (2003), Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.), Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555-576.

(17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999), Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995), Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.

(19) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ (ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1).

(20) Edwards C.A. και Bohlen P.J. (1996), Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. και Römbke J. (2009), Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Available for download at: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf

(23) Elmegaard N. and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995), Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003), Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996), How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994), The assessment of bioaccumulation, *Chemosphere* 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996), Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae), Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003), Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, *Ökotox.* 15: 78-84.

(30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990), A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes, *Wat. Res.* 24: 1225-1231.

(31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985), Micromethods for lipids in aquatic invertebrates, *Limnology and Oceanography* 30: 1099-1105.

(32) Hawker DW και Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K. και Wiechering H. (2000), Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests, *J. Soils Sediments* 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

(36) Jaenike J. (1982), «*Eisenia foetida*» is two biological species, *Megadrilogica* 4: 6-8.

(37) Jager T. (1998), Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta), *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080-2090.

(38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000), Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil, *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 953-961.

(39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., DeJong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G.M. (2003a), Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures, *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767-775.

(40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b), Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta), *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399-3404.

(41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991), Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.

(42) Kasprzak K. (1982), Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems, *Pedobiologia* 23: 217-232.

(43) Khalil A.M. (1990), Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum P.F. (1989), Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi, Environ. Sci. Toxicol.* 23: 588-595.

(45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions, *Ecotox. Environ. Safety* 36: 17-26.

(46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999), Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates, Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1244-1249.

▼**M4**

(47) Nendza M. (1991), QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, στο: R. Nagel και R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος – Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.

(49) Κεφάλαιο Γ.13 του παρόντος παραρτήματος – Βιοσυγκέντρωση: δοκιμή σε ψάρια με συνεχή ροή νερού.

(50) Κεφάλαιο Γ.21 του παρόντος παραρτήματος – Μικροοργανισμοί εδάφους: δοκιμή μετατροπής αζώτου.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) Oecd (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(54) Petersen H. και Luxton M. (1982), A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes, *Oikos* 39: 287-388.

(55) Phillips D.J.H. (1993), Bioaccumulation, στο: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford, 378-396.

(56) Pflugmacher J. (1992), Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem, *Ökotox.* 4: 77-81.

(57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996), Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida,* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall R.C., Lee II H., Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991), Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation, *Environ.Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.

(59) Römbke J., Egele, P., Füll C. (1998), Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J. και Moser Th. (1999), Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test, UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W., Canton J.H. (1993), Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains, *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107-127.

(63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efroymson R.A. (1999), Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation, *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H.-J. και Riepert F. (1992), Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung, *Zool. Beitr.* NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R. και Collado R. (1999), *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida), *Carolinea* 57: 93–100.

▼**M4**

(66) Sims R.W. και Gerard B.M. (1985), Earthworms, στο: Kermack D. M. & Barnes R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S, London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000), Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod, *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557–2563.

(68) Spacie A. και Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish, *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.

(69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998), Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003), Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta, Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991), Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000), Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen T.C. και Van Straalen N.M. (1996), Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber, Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.

(74) Van Gestel C.A.M. (1992), The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms, a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker H., Edwards P.J., Greig-Smith P.W. & Heimbach F.), Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel C.A. και Ma W.-C. (1990), An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies, *Chemosphere* 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005), Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates, *Environmental Pollution* 136: 409-417.

(77) Venter J.M. και Reinecke A.J. (1988), The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta), South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel CAM (2005), Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B. και Van Straalen N.M. (1996), Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402-406.

▼M4

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Αποβολή μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας είναι η απώλεια της χημικής αυτής ουσίας από τον ιστό του οργανισμού δοκιμής με ενεργητικές ή παθητικές διεργασίες, ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία του υπό δοκιμή στοιχείου στο περιβάλλον μέσο.

Βιομεγέθυνση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού, η οποία οφείλεται κυρίως στην πρόσληψη από μολυσμένη τροφή ή λεία, σε σχέση με τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή ή τη λεία. Η βιομεγέθυνση μπορεί να οδηγήσει σε μεταφορά ή συσσώρευση του υπό δοκιμή στοιχείου στις τροφικές αλυσίδες.

Βιοσυγκέντρωση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού, η οποία οφείλεται στην πρόσληψη της χημικής ουσίας αποκλειστικά από το περιβάλλον μέσο (δηλαδή μέσω της επιφάνειας του σώματος και του καταποθέντος εδάφους), σε σχέση με τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο.

Βιοσυσσώρευση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο. Η βιοσυσσώρευση προκύπτει από τις διαδικασίες βιοσυγκέντρωσης και βιομεγέθυνσης (βλέπε κατωτέρω).

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Η **οριζοντίωση** ή **σταθερή κατάσταση** ορίζεται ως η ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών πρόσληψης και αποβολής που συντελούνται ταυτόχρονα κατά τη φάση έκθεσης. Η σταθερή κατάσταση στη γραφική παράσταση του BAF συναρτήσει του χρόνου επιτυγχάνεται όταν η καμπύλη καθίσταται παράλληλη με τον άξονα του χρόνου και τρεις διαδοχικοί προσδιορισμοί του BAF σε δείγματα που έχουν ληφθεί ανά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών δεν διαφέρουν μεταξύ τους σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20 %, χωρίς να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών περιόδων δειγματοληψίας. Στην περίπτωση ελεγχόμενων χημικών ουσιών που προσλαμβάνονται με αργό ρυθμό, ενδείκνυνται περισσότερο διαστήματα επτά ημερών (49).

Σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει τον ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής, μετά τη μεταφορά των οργανισμών δοκιμής από μέσο που περιέχει το υπό δοκιμή στοιχείο σε μέσο που δεν περιέχει τη χημική ουσία· η k_e εκφράζεται σε ημέρα^{-1}.

Σταθερά ταχύτητας πρόσληψης εδάφους (k_s) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει τον ρυθμό αύξησης της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής, η οποία οφείλεται στην πρόσληψη από την εδαφική φάση. Η k_s εκφράζεται σε g εδάφους·kg^{-1} σκώληκα·ημέρα^{-1}.

Συντελεστής βιοσυσσώρευσης (BAF) σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, στο πλαίσιο της παρούσας δοκιμής βιοσυσσώρευσης, είναι το πηλίκο της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής (C_a, σε g·kg^{-1} ξηρού βάρους σκώληκα) διά της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο (C_s, σε g·kg^{-1} ξηρού βάρους εδάφους) και εκφράζεται σε kg·εδάφους· kg^{-1} σκώληκα.

Συντελεστής βιοσυσσώρευσης σε σταθερή κατάσταση (BAFss) είναι ο BAF σε σταθερή κατάσταση και δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια παρατεταμένης χρονικής περιόδου, δεδομένου ότι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο (C_s, σε g·kg^{-1} ξηρού βάρους εδάφους) είναι σταθερή κατά τη διάρκεια της εν λόγω χρονικής περιόδου.

Ο **συντελεστής βιοσυσσώρευσης** που υπολογίζεται απευθείας από τον λόγο της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης εδάφους προς τη σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_s και k_e, βλέπε ανωτέρω) ονομάζεται συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAF_K).

▼M4

Συντελεστής κατανομής σε οκτανόλη-νερό (K_{ow}) είναι ο λόγος της διαλυτότητας μιας χημικής ουσίας σε n-οκτανόλη προς τη διαλυτότητά της στο νερό, σε κατάσταση ισορροπίας, συμβολιζόμενος και ως P_{ow}. Ο λογάριθμος του K_{ow} (log K_{ow}) χρησιμοποιείται ως ένδειξη του δυναμικού βιοσυσσώρευσης μιας χημικής ουσίας από υδρόβιους οργανισμούς.

Συντελεστής κατανομής σε οργανικό άνθρακα-νερό (K_{oc}) είναι ο λόγος της συγκέντρωσης μιας χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του κλάσματος οργανικού άνθρακα του εδάφους προς τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο νερό, σε κατάσταση ισορροπίας.

Συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-έδαφος (BSAF) είναι το πηλίκο της κανονικοποιημένης ως προς τα λιπίδια συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής διά της κανονικοποιημένης ως προς τον οργανικό άνθρακα συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος, σε σταθερή κατάσταση. Στην περίπτωση αυτή, η C_a εκφράζεται σε $g \cdot kg^{-1}$ λιπιδικού περιεχομένου του οργανισμού και η C_s σε $g \cdot kg^{-1}$ περιεκτικότητας του εδάφους σε οργανικό άνθρακα. Ο BSAF εκφράζεται σε kg $OC \cdot kg^{-1}$ λιπιδίων.

Φάση αποβολής είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο μελετάται η αποβολή (ή η καθαρή απώλεια) της χημικής ουσίας από τους οργανισμούς δοκιμής, μετά τη μεταφορά των οργανισμών δοκιμής από μολυσμένο μέσο σε μέσο που δεν περιέχει το υπό δοκιμή στοιχείο.

Φάση έκθεσης ή πρόσληψης είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι οργανισμοί δοκιμής εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία.

▼M4

Προσάρτημα 2

Υπολογισμός των παραμέτρων πρόσληψης και αποβολής

Το κύριο καταληκτικό σημείο μιας δοκιμής βιοσυσσώρευσης είναι ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης, BAF. Ο μετρούμενος BAF μπορεί να υπολογιστεί με διαίρεση της συγκέντρωσης στον οργανισμό δοκιμής, C_a, διά της συγκέντρωσης στο έδαφος, C_s, σε σταθερή κατάσταση. Εάν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, αντί του BAFss υπολογίζεται ο BAF_K από τις σταθερές ταχύτητας. Ωστόσο, θα πρέπει να επισημαίνεται αν ο BAF βασίζεται σε συγκεντρώσεις σταθερής κατάστασης ή όχι.

Ο συνήθης τρόπος λήψης του συντελεστή κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAF_K), της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης εδάφους (k_s) και της σταθεράς ταχύτητας αποβολής (k_e) είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή, π.χ., με βάση τα μοντέλα που περιγράφονται στη βιβλιογραφική παραπομπή (68). Με βάση ένα σύνολο διαδοχικών δεδομένων χρόνου-συγκέντρωσης και τις εξισώσεις μοντέλου:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[εξίσωση 1]}$$

ή

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[εξίσωση 2]}$$

όπου:

C_a = συγκέντρωση της χημικής ουσίας στους σκώληκες [g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους]

k_s = σταθερά ταχύτητας πρόσληψης στον ιστό [g εδάφους kg^{-1} σκώληκα $ημέρα^{-1}$]

C_s = συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο έδαφος [g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους]

ke = σταθερά ταχύτητας αποβολής [$ημέρα^{-1}$]

tc = ο χρόνος στο τέλος της φάσης πρόσληψης,

τα εν λόγω προγράμματα ηλεκτρονικών υπολογιστών υπολογίζουν τις τιμές BAF_K, k_s και k_e.

Όταν η συγκέντρωση υποβάθρου στους μη εκτεθειμένους σκώληκες π.χ. κατά την ημέρα 0, διαφέρει σημαντικά από το μηδέν (αυτό μπορεί να ισχύει, π.χ., για τα μέταλλα), αυτή η συγκέντρωση υποβάθρου ($C_{a,0}$) θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στις ανωτέρω εξισώσεις, οπότε προκύπτουν οι εξισώσεις:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[εξίσωση 3]}$$

και

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[εξίσωση 4]}$$

Στις περιπτώσεις όπου παρατηρείται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα ακόλουθα μοντέλα, π.χ. (67)(79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{[εξίσωση 5]}$$

▼M4

όπου:

C_s = συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο έδαφος [g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους]

k_0 = σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης στο έδαφος [$ημέρα^{-1}$]

C_0 = αρχική συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο έδαφος [g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[εξίσωση 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[εξίσωση 7]}$$

όπου:

C_a = συγκέντρωση της χημικής ουσίας στους σκώληκες [g kg^{-1} υγρού ή ξηρού βάρους]

k_s = σταθερά ταχύτητας πρόσληψης στον ιστό [g εδάφους kg^{-1} σκώληκα $ημέρα^{-1}$]

k_0 = σταθερά ταχύτητας αποικοδόμησης στο έδαφος [$ημέρα^{-1}$]

ke = σταθερά ταχύτητας αποβολής [$ημέρα^{-1}$]

t_c = ο χρόνος στο τέλος της φάσης πρόσληψης.

Όταν η σταθερή κατάσταση επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης (δηλαδή $t = \infty$), η εξίσωση 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[εξίσωση 1]}$$

μπορεί να απλοποιηθεί σε:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ή

$$C_a/C_s = k_s/k_e = BAF_K \qquad \text{[εξίσωση 8]}$$

Στη συνέχεια, η σχέση $k_s/k_e \times C_s$ είναι μια προσέγγιση για τη συγκέντρωση του υπό δοκιμή στοιχείου στον ιστό του σκώληκα σε σταθερή κατάσταση ($C_{a,ss}$).

Ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-έδαφος (BSAF) μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[εξίσωση 9]}$$

όπου f_{oc} είναι το κλάσμα του οργανικού άνθρακα του εδάφους και f_{lip} το κλάσμα των λιπιδίων του σκώληκα, προσδιοριζόμενα και τα δύο, κατά προτίμηση, σε δείγματα που έχουν ληφθεί από τη δοκιμή και με βάση είτε το ξηρό είτε το υγρό βάρος, αντίστοιχα.

Η κινητική αποβολής μπορεί να μοντελοποιηθεί με τη χρήση των δεδομένων από τη φάση αποβολής και την εφαρμογή της ακόλουθης εξίσωσης μοντέλου και μιας μεθόδου εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή. Εάν η γραφική παράσταση των σημείων δεδομένων συναρτήσει του χρόνου δηλώνει σταθερή εκθετική μείωση της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου στα ζώα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μονοδιαμερισματικό μοντέλο (εξίσωση 9) για την περιγραφή της χρονικής εξέλιξης της αποβολής.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[εξίσωση 10]}$$

▼**M4**

Μερικές φορές, οι διεργασίες αποβολής φαίνεται να είναι διφασικές, εμφανίζοντας ταχεία μείωση της C_a κατά τα πρώτα στάδια, η οποία μεταλλάσσεται σε βραδύτερη απώλεια των υπό δοκιμή στοιχείων κατά τα επόμενα στάδια της αποβολής, π.χ. (27)(68). Οι δύο φάσεις μπορούν να ερμηνευθούν με την παραδοχή ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά διαμερίσματα στον οργανισμό, από τα οποία το υπό δοκιμή στοιχείο απομακρύνεται με διαφορετικές ταχύτητες. Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να μελετάται η ειδική βιβλιογραφία, π.χ. (38)(39)(40)(78).

Με τη βοήθεια των ανωτέρω εξισώσεων μοντέλου, οι κινητικές παράμετροι (k_s και k_e) μπορούν επίσης να υπολογιστούν με μία μόνο διαδικασία μέτρησης, μέσω της ταυτόχρονης εφαρμογής του μοντέλου κινητικής πρώτης τάξης σε όλα τα δεδομένα που προκύπτουν τόσο από τη φάση πρόσληψης, όσο και από τη φάση αποβολής. Για την περιγραφή μιας μεθόδου που επιτρέπει ενδεχομένως έναν τέτοιο συνδυασμένο υπολογισμό των σταθερών ταχύτητας πρόσληψης και αποβολής, βλέπε βιβλιογραφικές παραπομπές (41), (73) και (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[εξίσωση 11]}$$

Σημείωση: Όταν οι παράμετροι πρόσληψης και αποβολής υπολογίζονται ταυτόχρονα από τα συνδυασμένα δεδομένα πρόσληψης και αποβολής, το "m" που εμφαίνεται στην εξίσωση 11 είναι ένας περιγραφέας που επιτρέπει στο πρόγραμμα του υπολογιστή να αντιστοιχίσει τους επιμέρους όρους της εξίσωσης με τα σύνολα δεδομένων της κάθε φάσης και να εκτελέσει ορθώς την αξιολόγηση (m = 1 για τη φάση πρόσληψης, m = 2 για τη φάση αποβολής).

Παρ' όλα αυτά, οι ανωτέρω εξισώσεις μοντέλου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με επιφύλαξη, ιδίως όταν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής η βιοδιαθεσιμότητα ή η (βιο)αποικοδόμηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας [βλέπε π.χ. (79)].

▼**M4**

Προσάρτημα 3

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΔΟΚΙΜΕΣ ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Δοκιμή σε γαιοσκώληκες

α) Φάση πρόσληψης με 8 ημερομηνίες δειγματοληψίας για τον υπολογισμό της κινητικής

Ημέρα	Δραστηριότητα
– 6	Εγκλιματισμός του προετοιμασμένου εδάφους για 48 ώρες
– 4	Εμβολιασμός του κλάσματος εδάφους με το διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εξάτμιση του διαλύτη, ανάμειξη των συστατικών του εδάφους, κατανομή του εδάφους στα δοχεία δοκιμής, εξισορρόπηση στις συνθήκες δοκιμής για 4 ημέρες (3 εβδομάδες αν πρόκειται για έδαφος εμβολιασμένο με μέταλλα)
– 3 έως – 1	Διαχωρισμός των οργανισμών δοκιμής από την καλλιέργεια για εγκλιματισμό, προετοιμασία και ύγρανση των συστατικών του εδάφους
0	Μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, λήψη δειγμάτων εδάφους από τα δοχεία αγωγής και τους μάρτυρες διαλύτη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, προσθήκη τροφής, ζύγιση και τυχαία κατανομή των σκωλήκων στα δοχεία δοκιμής, κράτηση επαρκών επιμέρους δειγμάτων σκωλήκων για τον προσδιορισμό των αναλυτικών τιμών υποβάθρου, του υγρού και ξηρού βάρους και του λιπιδικού περιεχομένου, ζύγιση όλων των δοχείων δοκιμής για τον έλεγχο της υγρασίας του εδάφους, έλεγχος της παροχής αέρα, εάν χρησιμοποιείται κλειστό σύστημα δοκιμών
1	Έλεγχος της παροχής αέρα, καταγραφή της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας, δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου
2	Ομοίως με την 1η ημέρα
3	Έλεγχος της παροχής αέρα, της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας
4	Ομοίως με την 1η ημέρα,
5 - 6	Ομοίως με την 3η ημέρα,
7	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής και αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού
8 - 9	Ομοίως με την 3η ημέρα,
10	Ομοίως με την 1η ημέρα,
11 - 13	Ομοίως με την 3η ημέρα,
14	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής και αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού
15 - 16	Ομοίως με την 3η ημέρα
17	Ομοίως με την 1η ημέρα
18 - 20	Ομοίως με την 3η ημέρα

▼**M4**

Ημέρα	Δραστηριότητα
21	Ομοίως με την 1η ημέρα· μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής, τέλος της φάσης πρόσληψης, μεταφορά των σκωλήκων από τα υπόλοιπα εκτεθέντα πολλαπλά δοχεία σε δοχεία που περιέχουν καθαρό έδαφος για τη φάση αποβολής (χωρίς κένωση εντέρου), δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων από τους μάρτυρες διαλύτη.
	Οι δραστηριότητες πριν από την έκθεση (φάση εξισορρόπησης) θα πρέπει να προγραμματίζονται με γνώμονα τις ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.
	Οι δραστηριότητες που περιγράφονται για την 3η ημέρα πρέπει να διεξάγονται καθημερινά (τουλάχιστον κατά τις εργάσιμες ημέρες).

β) Φάση αποβολής

Ημέρα	Δραστηριότητα
– 6	Προετοιμασία και ύγρανση των συστατικών του εδάφους, εγκλιματισμός του προετοιμασμένου εδάφους για 48 ώρες
– 4	Ανάμειξη των συστατικών του εδάφους, κατανομή του εδάφους στα δοχεία δοκιμής, επώαση στις συνθήκες δοκιμής για 4 ημέρες
0 (τέλος της φάσης πρόσληψης)	Μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, ζύγιση και τυχαία κατανομή των σκωλήκων στα δοχεία δοκιμής, προσθήκη τροφής, μεταφορά των σκωλήκων από τα υπόλοιπα εκτεθέντα πολλαπλά δοχεία σε δοχεία που περιέχουν καθαρό έδαφος, δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων μετά από 4 - 6 ώρες για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας
1	Έλεγχος της παροχής αέρα, καταγραφή της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας, δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας
2	Ομοίως με την 1η ημέρα
3	Έλεγχος της παροχής αέρα, της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας
4	Ομοίως με την 1η ημέρα
5 - 6	Ομοίως με την 3η ημέρα
7	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής και αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού
8 - 9	Ομοίως με την 3η ημέρα
10	Ομοίως με την 1η ημέρα
11 - 13	Ομοίως με την 3η ημέρα
14	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής και αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού
15 - 16	Ομοίως με με την 3η ημέρα
17	Ομοίως με την 1η ημέρα

▼**M4**

Ημέρα	Δραστηριότητα
18 - 20	Ομοίως με την 3η ημέρα
21	Ομοίως με την 1η ημέρα· μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής, δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων από τους μάρτυρες διαλύτη
	Η προετοιμασία του εδάφους πριν από την έναρξη της φάσης αποβολής θα πρέπει να γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως πριν από τη φάση πρόσληψης.
	Οι δραστηριότητες που περιγράφονται για την 3η ημέρα πρέπει να διεξάγονται καθημερινά (τουλάχιστον κατά τις εργάσιμες ημέρες).

Δοκιμή σε Enchytraeidae

α) Φάση πρόσληψης με 8 ημερομηνίες δειγματοληψίας για τον υπολογισμό της κινητικής

Ημέρα	Δραστηριότητα
– 6	Εγκλιματισμός του προετοιμασμένου εδάφους για 48 ώρες
– 4	Εμβολιασμός του κλάσματος εδάφους με το διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εξάτμιση του διαλύτη, ανάμειξη των συστατικών του εδάφους, κατανομή του εδάφους στα δοχεία δοκιμής, εξισορρόπηση στις συνθήκες δοκιμής για 4 ημέρες (3 εβδομάδες, αν πρόκειται για έδαφος εμβολιασμένο με μέταλλα)
– 3 έως – 1	Διαχωρισμός των οργανισμών δοκιμής από την καλλιέργεια για εγκλιματισμό, προετοιμασία και ύγρανση των συστατικών του εδάφους
0	Μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, λήψη δειγμάτων εδάφους από τα δοχεία αγωγής και τους μάρτυρες διαλύτη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, προσθήκη τροφής στο έδαφος, ζύγιση και τυχαία κατανομή των σκωλήκων στα δοχεία δοκιμής, κράτηση επαρκών επιμέρους δειγμάτων σκωλήκων για τον προσδιορισμό των αναλυτικών τιμών υποβάθρου, του υγρού και ξηρού βάρους και του λιπιδικού περιεχομένου, ζύγιση όλων των δοχείων δοκιμής για τον έλεγχο της υγρασίας του εδάφους, έλεγχος της παροχής αέρα, εάν χρησιμοποιείται κλειστό σύστημα δοκιμών
1	Έλεγχος της παροχής αέρα, καταγραφή της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας, δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του υπό δοκιμή στοιχείου
2	Ομοίως με την 1η ημέρα
3	Έλεγχος της παροχής αέρα, της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας
4	Ομοίως με την 1η ημέρα
5 - 6	Ομοίως με την 3η ημέρα
7	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής στο έδαφος, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής και αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού
9	Ομοίως με την 1η ημέρα
10	Ομοίως με την 3η ημέρα

▼**M4**

Ημέρα	Δραστηριότητα
11	Ομοίως με την 1η ημέρα
12 - 13	Ομοίως με την 3η ημέρα
14	Ομοίως με την 1η ημέρα· προσθήκη τροφής στο έδαφος, μέτρηση της θερμοκρασίας και του pH του εδάφους, έλεγχος της υγρασίας του εδάφους με νέα ζύγιση των δοχείων δοκιμής, τέλος της φάσης πρόσληψης, μεταφορά των σκωλήκων από τα υπόλοιπα εκτεθέντα πολλαπλά δοχεία σε δοχεία που περιέχουν καθαρό έδαφος για τη φάση αποβολής (χωρίς κένωση εντέρου), δειγματοληψία εδάφους και σκωλήκων από τους μάρτυρες διαλύτη
	Οι δραστηριότητες πριν από την έκθεση (φάση εξισορρόπησης) θα πρέπει να προγραμματίζονται με γνώμονα τις ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.
	Οι δραστηριότητες που περιγράφονται για την 3η ημέρα πρέπει να διεξάγονται καθημερινά (τουλάχιστον κατά τις εργάσιμες ημέρες).

▼M4

Προσάρτημα 4

Τεχνητό έδαφος — συστάσεις για την παρασκευή και την αποθήκευση

Επειδή ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμο φυσικό έδαφος από μια συγκεκριμένη πηγή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και οι αυτόχθονες οργανισμοί, καθώς και η παρουσία μικρορύπων, μπορούν να επηρεάσουν τη δοκιμή, συνιστάται να χρησιμοποιείται στην παρούσα δοκιμή τεχνητό υπόστρωμα —το τεχνητό έδαφος κατά το κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος "Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες"(48). Διάφορα υπό δοκιμή είδη μπορούν να επιβιώνουν, να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται στο έδαφος αυτό, ενώ εξασφαλίζεται μέγιστη τυποποίηση, καθώς και ενδοεργαστηριακή και διεργαστηριακή συγκρισιμότητα των συνθηκών δοκιμής και των καλλιέργειας.

Συστατικά του εδάφους

Τύρφη:	10 %	Τύρφη σφάγνων, σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή 207 του ΟΟΣΑ (48)
Χαλαζιακή άμμος:	70 %	Βιομηχανική χαλαζιακή άμμος (αερόξηρη). Κοκκομετρία: άνω του 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να έχουν μέγεθος 50-200 μm, αλλά όλα τα σωματίδια θα πρέπει να είναι ≤ 2 mm
Καολινιτική άργιλος:	20 %	Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 %
Ανθρακικό ασβέστιο:	≤ 1 %	$CaCO_3$, κονιοποιημένο, χημικά καθαρό

Προαιρετικά, μπορεί να μειωθεί η περιεκτικότητα του τεχνητού εδάφους σε οργανικό άνθρακα, π.χ. με ελάττωση της περιεκτικότητας σε τύρφη σε 4-5 % επί ξηρού εδάφους και ανάλογη αύξηση της περιεκτικότητας σε άμμο. Με αυτή τη μείωση της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, είναι δυνατόν να μειωθούν οι δυνατότητες προσρόφησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο έδαφος (οργανικός άνθρακας) και να αυξηθεί η διαθεσιμότητά της για τους σκώληκες (74). Έχει καταδειχθεί ότι τα είδη *Enchytraeus albidus* και *Eisenia fetida* μπορούν να πληρούν τα κριτήρια εγκυρότητας σχετικά με την αναπαραγωγή, όταν υποβάλλονται σε δοκιμές με γεωργικά εδάφη χαμηλότερης περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, π.χ. 2,7 % (33), (61), και η πείρα δείχνει ότι αυτό μπορεί να επιτευχθεί και σε τεχνητό έδαφος με 5 % τύρφης.

Παρασκευή

Τα ξηρά συστατικά του εδάφους αναμιγνύονται επιμελώς (π.χ. σε εργαστηριακό αναμείκτη μεγάλης κλίμακας). Αυτό θα πρέπει να γίνεται περίπου μία εβδομάδα πριν από την έναρξη της δοκιμής. Το μείγμα των ξηρών συστατικών του εδάφους πρέπει να υγραίνεται με απιονισμένο νερό, τουλάχιστον 48 ώρες πριν από την εφαρμογή του υπό δοκιμή στοιχείου, για την εξισορρόπηση/σταθεροποίηση της οξύτητας. Για τον προσδιορισμό του pH χρησιμοποιείται μείγμα εδάφους και διαλύματος KCl 1 M σε αναλογία 1:5. Εάν η τιμή του pH δεν περικλείεται εντός του απαιτούμενου εύρους (6,0 ± 0,5), προστίθεται στο έδαφος επαρκής ποσότητα $CaCO_3$ ή παρασκευάζεται νέα παρτίδα εδάφους.

Η μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHC) του τεχνητού εδάφους προσδιορίζεται σύμφωνα με το πρότυπο ISO 11268-2 (35). Τουλάχιστον δύο ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, το ξηρό τεχνητό έδαφος υγραίνεται με την προσθήκη επαρκούς ποσότητας απιονισμένου ή ανασυσταθέντος νερού ώστε να επιτευχθεί περίπου το ήμισυ της τελικής υγρασίας, η οποία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης WHC. Κατά την έναρξη της δοκιμής, το προηγουμένως υγρανθέν έδαφος χωρίζεται σε τόσες παρτίδες όσες και ο αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής και των μαρτύρων που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή και η υγρασία ρυθμίζεται σε 40-60 % της μέγιστης WHC με το διάλυμα του υπό δοκιμή στοιχείου και/ή με την προσθήκη απιονισμένου ή ανασυσταθέντος νερού. Η υγρασία προσδιορίζεται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής (στους 105 °C) και θα πρέπει να είναι η βέλτιστη για τις ανάγκες των ειδών (μπορεί επίσης να ελεγχθεί ως εξής: όταν το έδαφος συμπιέζεται ήπια με το χέρι, θα πρέπει να εμφανίζονται μικρές σταγόνες νερού μεταξύ των δακτύλων).

▼**M4**

Αποθήκευση

Τα ξηρά συστατικά του τεχνητού εδάφους μπορούν να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση. Το έτοιμο, προηγουμένως υγρανθέν έδαφος μπορεί να φυλάσσεται σε δροσερό χώρο για μέγιστο χρονικό διάστημα τριών ημερών πριν από τον εμβολιασμό. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την ελαχιστοποίηση της εξάτμισης του νερού. Το έδαφος που έχει εμβολιαστεί με το υπό δοκιμή στοιχείο θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως, εκτός εάν υπάρχουν πληροφορίες σύμφωνα με τις οποίες το συγκεκριμένο έδαφος μπορεί να αποθηκεύεται χωρίς να επηρεάζονται η τοξικότητα και η βιοδιαθεσιμότητα του υπό δοκιμή στοιχείου. Στη συνέχεια, δείγματα του εμβολιασμένου εδάφους μπορούν να φυλάσσονται στις συνθήκες που συνιστώνται για το συγκεκριμένο υπό δοκιμή στοιχείο, μέχρι την ανάλυση.

▼M4

Προσάρτημα 5

Είδη χερσαίων ολιγοχαίτων που συνιστώνται για τη δοκιμή βιοσυσσώρευσης από το έδαφος

Γαιοσκώληκες

Το συνιστώμενο για τη δοκιμή είδος είναι το *Eisenia fetida* (Savigny 1826), που ανήκει στην οικογένεια Lumbricidae. Από το 1972 διακρίνονται δύο υποείδη [*Eisenia fetida* και *Eisenia andrei* (10)]. Κατά τον Jaenike (36), είναι γνήσια χωριστά είδη. Το *Eisenia fetida* αναγνωρίζεται εύκολα από τις φωτεινές μεσοτμηματικές κίτρινες ταινίες του, ενώ το *Eisenia andrei* έχει ομοιόμορφο, σκούρο κόκκινο χρώμα. Προέρχονται πιθανότατα από την περιοχή του Εύξεινου Πόντου και σήμερα είναι εμφανίζουν παγκόσμια κατανομή, ιδίως σε ανθρωπογενώς τροποποιημένα ενδιαιτήματα, όπως σε σωρούς κομποστοποίησης. Μπορούν και τα δύο να χρησιμοποιηθούν για οικοτοξικολογικές δοκιμές, καθώς και για δοκιμές βιοσυσσώρευσης.

Τα *Eisenia fetida* και *Eisenia andrei* διατίθενται στο εμπόριο, π.χ. ως δόλωμα για ψάρια. Σε σύγκριση με άλλους γαιοσκώληκες της οικογένειας Lumbricidae, έχουν μικρό κύκλο ζωής, φθάνοντας σε ωρίμαση σε 2 έως 3 μήνες περίπου (σε θερμοκρασία δωματίου). Η βέλτιστη θερμοκρασία τους είναι περίπου 20-24 °C. Προτιμούν σχετικώς υγρά υποστρώματα με σχεδόν ουδέτερο pH και υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ύλη. Δεδομένου ότι τα είδη αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως σε τυποποιημένες οικοτοξικολογικές δοκιμές για περίπου 25 χρόνια, η καλλιέργεια τους έχει καθιερωθεί (48)(77).

Τα δύο είδη μπορούν να αναπαράγονται σε ευρύ φάσμα ζωικών αποβλήτων. Το μέσο αναπαραγωγής που συνιστά ο ISO (35) είναι ένα μείγμα κοπριάς αλόγου ή βοοειδών και τύρφης σε αναλογία 50:50. Το μέσο θα πρέπει να έχει τιμή pH περίπου 6 έως 7 (ρυθμίζεται με ανθρακικό ασβέστιο), χαμηλή ιοντική αγωγιμότητα (κάτω των 6 mS/cm ή συγκέντρωση άλατος κάτω του 0,5 %) και να μην είναι υπερβολικά μολυσμένο από αμμωνία ή ούρα ζώων. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα διαθέσιμο στο εμπόριο χώμα κηπουρικής χωρίς πρόσθετα ή τεχνητό έδαφος σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ (48) ή μείγμα των δύο σε αναλογία 50:50. Το υπόστρωμα πρέπει να είναι υγρό αλλά όχι μουσκεμένο. Κατάλληλα για χρήση είναι τα κουτιά αναπαραγωγής των 10 έως 50 λίτρων.

Για να ληφθούν σκώληκες κανονικής ηλικίας και μάζας, είναι προτιμότερο να αρχίσει η καλλιέργεια με κουκούλια. Ως εκ τούτου, προστίθενται ενήλικοι σκώληκες σε ένα κουτί αναπαραγωγής που περιέχει φρέσκο υπόστρωμα για την παραγωγή κουκουλιών. Η πρακτική εμπειρία δείχνει ότι επιτυγχάνονται ικανοποιητικά ποσοστά αναπαραγωγής με πυκνότητα πληθυσμού περίπου 100 ενήλικων σκωλήκων ανά kg υποστρώματος (υγρό βάρος). Μετά από 28 ημέρες, απομακρύνονται οι ενήλικοι σκώληκες. Οι γαιοσκώληκες που έχουν εκκολαφθεί από τα κουκούλια χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή όταν ωριμάσουν, μετά από τουλάχιστον 2 μήνες, αλλά σε λιγότερο από 12 μήνες.

Οι σκώληκες των ειδών που περιγράφονται ανωτέρω θεωρούνται υγιείς εάν κινούνται μέσα στο υπόστρωμα, δεν προσπαθούν να το εγκαταλείψουν και αναπαράγονται συνεχώς. Η πολύ αργή κίνηση ή ένα κίτρινο οπίσθιο άκρο (στην περίπτωση των *Eisenia fetida*) υποδηλώνει εξάντληση του υποστρώματος. Στην περίπτωση αυτή, συνιστάται η ανανέωση του υποστρώματος και/ή η μείωση του αριθμού των ζώων ανά κουτί.

Πρόσθετες επιλεγμένες βιβλιογραφικές παραπομπές

Gerard B.M. (1964), Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. *Linnean Soc. London* 6: 1-58.

Graff O. (1953), Die Regenwürmer Deutschlands, *Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch.* 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997), Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977), Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden, *Oikos* 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955), Some aspects of earthworm ecology, *Soil Zoology* (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims R.W. και Gerard B.M. (1985), A synopsis of the earthworms, *Linnean Soc. London* 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984), The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture, Satchell J.E. (ed.), Chapman & Hall, London, 331-338 pp.

Enchytraeidae

Το συνιστώμενο για τη δοκιμή είδος είναι το *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (λευκός σκώληκας). Τα *Enchytraeus albidus* είναι ένα από τα μεγαλύτερου μήκους (έως 15 mm) είδη της οικογένειας Enchytraeidae, με παγκόσμια κατανομή, π.χ. (8). Το *Enchytraeus albidus* εντοπίζεται σε θαλάσσια, λιμναία και χερσαία ενδιαιτήματα, κυρίως σε αποσυντιθέμενη οργανική ύλη (φύκια, κομπόστ) και σπανίως σε λειμώνες (42). Αυτή η ευρεία οικολογική ανοχή και ορισμένες μορφολογικές παραλλαγές δείχνουν ότι μπορεί να υπάρχουν διαφορετικές φυλές αυτού του είδους.

Το *Enchytraeus albidus* είναι διαθέσιμο στο εμπόριο, πωλούμενο ως τροφή για ψάρια. Θα πρέπει να ελέγχεται αν η καλλιέργεια είναι μολυσμένη από άλλα, συνήθως μικρότερα είδη (60). Σε περίπτωση μόλυνσης, όλοι οι σκώληκες θα πρέπει να εκπλύνονται με νερό σε τρυβλίο Petri. Στη συνέχεια, επιλέγονται μεγάλα ενήλικα δείγματα *Enchytraeus albidus* (με τη χρήση στερεομικροσκοπίου) για να ξεκινήσει μια νέα καλλιέργεια. Όλοι οι υπόλοιποι σκώληκες απορρίπτονται. Ο κύκλος ζωής τους είναι σύντομος, καθώς φθάνουν σε ωρίμαση εντός 33 (στους 18 °C) έως 74 ημερών (στους 12 °C). Για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο καλλιέργειες που έχουν παραμείνει στο εργαστήριο για τουλάχιστον 5 εβδομάδες (μία γενεά), χωρίς να έχουν παρουσιαστεί προβλήματα.

Κατάλληλα είναι και άλλα είδη του γένους *Enchytraeus*, ιδιαίτερα το *Enchytraeus luxuriosus*. Το είδος αυτό είναι πραγματικός κάτοικος του εδάφους, που έχει περιγραφεί πρόσφατα στη δημοσίευση (65). Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη *Enchytraeus*, θα πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς και να αιτιολογείται η επιλογή τους.

Το *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) είναι ένα είδος που ανήκει στην ίδια οικογένεια με το *Enchytraeus luxuriosus*. Δεν έχει διαπιστωθεί με βεβαιότητα αν απαντά στο έδαφος, δεδομένου ότι έχει περιγραφεί μόνο η παρουσία του σε καλλιέργειες γαιοσκωλήκων και σωρούς κομποστοποίησης (Römbke 2003). Επομένως, δεν είναι γνωστές οι αρχικές οικολογικές απαιτήσεις του. Ωστόσο, πρόσφατες εργαστηριακές μελέτες σε διάφορα γεωργικά εδάφη επιβεβαιώνουν ότι το είδος αυτό έχει ευρεία ανοχή προς τις ιδιότητες του εδάφους όπως το pH και η υφή (Jänsch και άλλοι 2005). Κατά τα τελευταία έτη, το είδος αυτό έχει συχνά χρησιμοποιηθεί σε οικοτοξικολογικές μελέτες, λόγω της απλής αναπαραγωγής και δοκιμής του, π.χ. Kuperman και άλλοι 2003). Ωστόσο, είναι μικρού μήκους (3-12 mm, 7 mm κατά μέσο όρο) (Westheide & Müller 1996), γεγονός που δυσχεραίνει τον χειρισμό του σε σύγκριση με το *Enchytraeus albidus*. Όταν χρησιμοποιείται το είδος αυτό αντί του *Enchytraeus albidus*, το μέγεθος του δοχείου δοκιμής μπορεί, χωρίς να είναι απαραίτητο, να είναι μικρότερο. Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι το είδος αυτό αναπαράγεται πολύ γρήγορα, με χρόνο γενεάς μικρότερο από 20 ημέρες στους 20 ± 2 °C (Achazi και άλλοι 1999) και ακόμη πιο γρήγορα σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Οι σκώληκες του είδους *Enchytraeus albidus* (καθώς και άλλα είδη *Enchytraeus*) μπορούν να αναπαράγονται σε μεγάλα πλαστικά κουτιά (π.χ. διαστάσεων 30 × 60 × 10 cm ή 20 × 12 × 8 cm, κατάλληλα για την καλλιέργεια σκωλήκων μικρού μεγέθους) τα οποία πληρούνται με ένα μείγμα τεχνητού εδάφους και διαθέσιμου στο εμπόριο, μη μολυσμένου χώματος κηπουρικής χωρίς πρόσθετα. Το υλικό κομποστοποίησης θα πρέπει να αποφεύγεται, δεδομένου ότι μπορεί να περιέχει τοξικές χημικές ουσίες, όπως βαρέα μέταλλα. Πριν από τη χρήση θα πρέπει να αφαιρείται η πανίδα από το έδαφος αναπαραγωγής, με τριπλή κατάψυξη. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί καθαρό τεχνητό έδαφος, αλλά ο ρυθμός αναπαραγωγής μπορεί να είναι βραδύτερος σε σύγκριση με εκείνον που επιτυγχάνεται με ανάμεικτα υποστρώματα. Το υπόστρωμα θα πρέπει να έχει pH 6,0 ± 0,5. Η καλλιέργεια διατηρείται σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 15 ± 2 °C χωρίς φως. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να αποφεύγονται θερμοκρασίες υψηλότερες από 23 °C. Όσον αφορά την υγρασία του τεχνητού/φυσικού εδάφους, αυτό θα πρέπει να είναι υγρό αλλά όχι μουσκεμένο. Όταν το έδαφος συμπιέζεται ήπια με το χέρι, θα πρέπει να εμφανίζονται μόνο μικρές σταγόνες νερού. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να αποφεύγονται οι ανοξικές συνθήκες (π.χ. εάν χρησιμοποιείται κάλυμμα, ο αριθμός των οπών του καλύμματος θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής εναλλαγή αέρα). Το έδαφος αναπαραγωγής θα πρέπει να αερίζεται με προσεκτική ανάμειξη μία φορά την εβδομάδα.

▼M4

Οι σκώληκες θα πρέπει να σιτίζονται τουλάχιστον μία φορά ανά εβδομάδα, κατά βούληση, με νιφάδες βρώμης οι οποίες τοποθετούνται σε μια κοιλότητα στην επιφάνεια του εδάφους και καλύπτονται με χώμα. Εάν η τροφή από την τελευταία ημερομηνία χορήγησης παραμένει στο δοχείο, θα πρέπει να προσαρμόζεται αναλόγως η ποσότητα της χορηγούμενης τροφής. Εάν αναπτύσσονται μύκητες στα υπολείμματα τροφής, αυτή θα πρέπει να αντικαθίσταται από νέα ποσότητα νιφάδων βρώμης. Προκειμένου να τονωθεί η αναπαραγωγή, οι νιφάδες βρώμης μπορούν να συμπληρώνονται με διαθέσιμη στο εμπόριο, τροποποιημένη βιταμινούχο σκόνη πρωτεΐνης ανά δύο εβδομάδες. Μετά από τρεις μήνες, τα ζώα μεταφέρονται σε προσφάτως παρασκευασμένη καλλιέργεια ή υπόστρωμα αναπαραγωγής. Οι νιφάδες βρώμης, οι οποίες θα πρέπει να φυλάσσονται σε σφραγισμένα δοχεία, πρέπει να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο ή να θερμαίνονται πριν από τη χρήση, ώστε να αποφεύγονται μολύνσεις από ακάρεα σιτηρών (π.χ. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) ή θηρευτικά ακάρεα [π.χ. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, Gamasida, Acarina*]. Μετά την απολύμανση, η τροφή αλέθεται ώστε να μπορεί εύκολα να διασκορπιστεί στην επιφάνεια του εδάφους. Μια άλλη πιθανή πηγή τροφής είναι οι ζύμες αρτοποιίας ή η τροφή ψαριών TetraMin®.

Σε γενικές γραμμές, οι συνθήκες καλλιέργειας είναι επαρκείς, εάν οι σκώληκες δεν προσπαθούν να εγκαταλείψουν το υπόστρωμα, κινούνται γρήγορα μέσα στο έδαφος, παρουσιάζουν στιλπνή εξωτερική επιφάνεια χωρίς προσκολλημένα σωματίδια του εδάφους, και έχουν περισσότερο ή λιγότερο υπόλευκο χρώμα, καθώς και εάν είναι ορατοί σκώληκες διαφόρων ηλικιών. Στην πραγματικότητα, οι σκώληκες μπορούν να θεωρηθούν υγιείς, εάν αναπαράγονται συνεχώς.

Πρόσθετες επιλεγμένες βιβλιογραφικές παραπομπές

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999), The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta), Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005), Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species, *Environ. Reviews* 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003), Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX, *Pedobiologia* 47: 651-656.

Römbke J. (2003), Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review, *Pedobiologia* 47: 607-616.

Westheide W. και Graefe U. (1992), Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida), *J. Nat. Hist.* 26: 479-488.

Westheide W. και Müller M.C. (1996), Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology, *Hydrobiologia* 334: 263-267.