

II

(Μη νομοθετικές πράξεις)

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 260/2014 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 24ης Ιανουαρίου 2014

για την τροποποίηση, με σκοπό την προσαρμογή του στην τεχνική πρόοδο, του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 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 ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη τη Συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη 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) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 της Επιτροπής⁽²⁾ περιλαμβάνει μεθόδους δοκιμών για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας ουσιών, οι οποίες πρέπει να εφαρμόζονται για τους σκοπούς του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006.
- (2) Είναι απαραίτητο να επικαιροποιηθεί ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 ώστε να συμπεριληφθούν κατά προτεραιότητα νέες και επικαιροποιημένες εναλλακτικές μέθοδοι δοκιμών που εγκρίθηκαν προσφάτως από τον ΟΟΣΑ, με σκοπό να επιτευχθεί μείωση στον αριθμό των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς σκοπούς, σύμφωνα με την οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς

σκοπούς⁽³⁾, και την οδηγία 86/609/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 24ης Νοεμβρίου 1986, για την προσέγγιση των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων των κρατών μελών σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς⁽⁴⁾.

- (3) Η προσαρμογή περιλαμβάνει δύο μεθόδους για τον προσδιορισμό φυσικοχημικών ιδιοτήτων, συγκεκριμένα επικαιροποίηση της μεθόδου δοκιμών υδατοδιαλυτότητας και μια νέα μέθοδο δοκιμών συντελεστή κατανομής που είναι σημαντική για την αξιολόγηση των ανθεκτικών, βιοσυσσωρευσίμων και τοξικών ουσιών (ΑΒΤ): τέσσερις νέες και μια επικαιροποιημένη μέθοδο για τον προσδιορισμό της οικοτοξικότητας και της πορείας και συμπεριφοράς στο περιβάλλον· εννέα μεθόδους για τον προσδιορισμό της τοξικότητας και άλλων επιδράσεων στην υγεία, συγκεκριμένα τέσσερις μεθόδους δοκιμών αναπνευστικής τοξικότητας, στις οποίες περιλαμβάνονται η επικαιροποίηση τριών μεθόδων και μια νέα μέθοδος για τη μείωση του αριθμού των χρησιμοποιούμενων ζώων και τη βελτίωση της αξιολόγησης των επιδράσεων, επικαιροποίηση της μεθόδου δοκιμών τοξικότητας 28 ημερών από το στόμα με επαναλαμβανόμενη δόση, ώστε να συμπεριληφθούν παράμετροι για την αξιολόγηση της ενδοκρινικής δραστηριότητας, επικαιροποίηση της μεθόδου δοκιμών τοξικοκινητικής που είναι σημαντική για τον σχεδιασμό και την κατανόηση τοξικολογικών μελετών, καθώς και επικαιροποίηση των μεθόδων δοκιμής χρόνιας τοξικότητας, δοκιμής καρκινογενετικότητας και συνδυασμένης δοκιμής χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας.
- (4) Συνεπώς, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 πρέπει να τροποποιηθεί αναλόγως.
- (5) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής που έχει συσταθεί βάσει του άρθρου 133 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006,

⁽¹⁾ ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1.⁽²⁾ ΕΕ L 142 της 31.5.2008, σ. 1.⁽³⁾ ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33.⁽⁴⁾ ΕΕ L 358 της 18.12.1986, σ. 1.

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 τροποποιείται σύμφωνα με το παράρτημα του παρόντος κανονισμού.

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 24 Ιανουαρίου 2014.

Για την Επιτροπή
Ο Πρόεδρος
José Manuel BARROSO

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 τροποποιείται ως εξής:

1. Το κεφάλαιο Α.6 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«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 $20 \pm 0,5$ °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 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

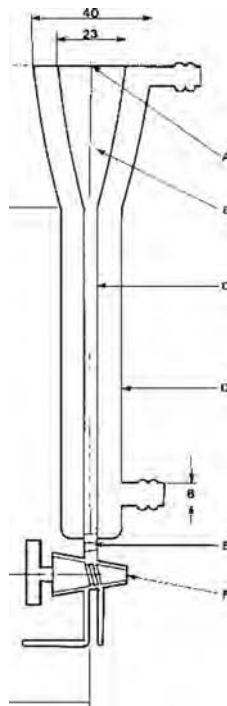
Μέθοδος έκλουσης στήλης**Αρχή**

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 προσμίξεις. 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 εσφυρισμένου συνδέσμου και σωληνώσεων από αδρανές υλικό. Η ταχύτητα ροής από το δοχείο ισοστάθμισης θα πρέπει να είναι περίπου 25 ml/ώρα.

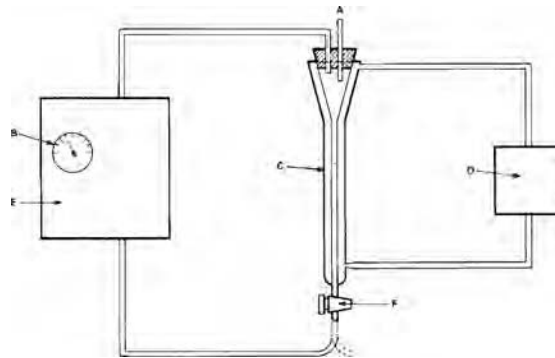
Σχήμα 1



Διαστάσεις σε mm

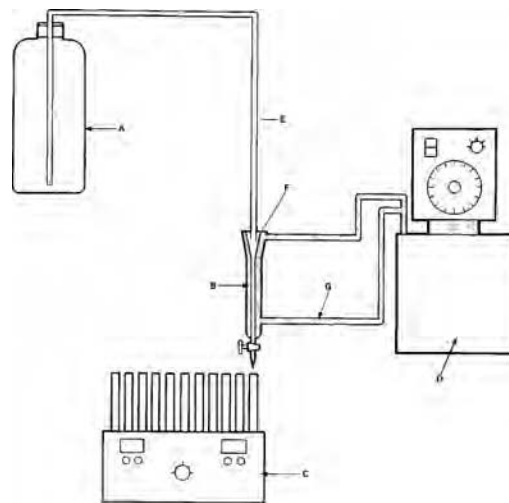
- A. Σύνδεση για γυάλινο σφυρισμένο σύνδεσμο
 B. Υπερκείμενος χώρος
 C. Εσωτερική διάμετρος 5
 D. Εξωτερική διάμετρος 19
 E. Βύσμα από υαλοβάμβακα
 F. Στρόφιγγα

Σχήμα 2



- A. Ατμοσφαιρική εξισορρόπηση
- B. Ροόμετρο
- C. Μικροστήλη
- D. Θερμοστατούμενη αντλία κυκλοφορίας
- E. Αντλία ανακυκλοφορίας
- F. Αμφίδρομη βαλβίδα για δειγματοληψία

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 έκλυσης, εξαιτίας της κατανομής του στην επιφάνεια. Το φορτισμένο υλικό στήριξης εμποτίζεται για δύο ώρες σε περίπου 5 ml νερού και το αώρημα μεταγίεται 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 αποθεθεί 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 $\pm 30\%$ 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.

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 $\pm 30\%$ σε πέντε τουλάχιστον διαδοχικά κλάσματα.
17. Προτιμότερο υγρό έκλουσης είναι το διασπασταμένο νερό. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης αποιονισμένο 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 φυγόκεντρου, 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 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 προεπόαση 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 προσμειξών 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 προσμειξεις (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 προσμειξεις και τη φυσική κατάσταση της ελεγχόμενης ουσίας.

Μέθοδος της φιάλης

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

- τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής δοκιμής,
- τη χημική ταυτότητα και τις προσμειξεις (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 προσμειξεις και τη φυσική κατάσταση της ελεγχόμενης ουσίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- (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.

2. Προστίθεται το κεφάλαιο Α.23:

«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 βιοσυσώρευσής τους στα ψάρια. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ο P_{OW} σχετίζεται με την ιχθυοτοξικότητα, καθώς και με τη ρόφιση 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 ιδιαίτερος 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.

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 δραστηριότητας 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 δίστανται ούτε συνδέονται και δεν εμφανίζουν σημαντική δραστηριότητα 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 διστάμενες ή συνδεδεμένες ενώσεις (παράγραφος 12).
12. Εξαιτίας των πολλαπλών ισορροπιών σε νερό και οκτανόλη-1 που υπεισέρχονται στην κατανομή σε μείγμα οκτανόλης-1/νερού διαστάμενων 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 βαθμό 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 ρηθμιστικά 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.
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:
- συντακτικός τύπος·
 - κατάλληλες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ουσίας στο νερό και σε οκτανόλη-1·
 - σταθερά (σταθερές) διάστασης ιονιζόμενων ουσιών [κατευθυντήρια γραμμή 112 του ΟΟΣΑ (9)]·
 - υδατοδιαλυτότητα (10)·
 - αβιοτική υδρόλυση (11)·
 - άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (12)·
 - 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):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

όπου

$$SR = S_{oct}/S_w \text{ (σε γραμμομοριακότητα κατ' όγκο),}$$

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, αφήνόμενοι 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),
- 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 αραιώση, 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).

(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.

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.
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 απομείνει 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 σηματομενά με ισότοπα (π.χ. υπερδευτεριωμένα ή σηματομενά με ^{13}C). Εάν δεν είναι δυνατή η χρήση σταθερών αναλόγων τα οποία είναι σηματομενά με ισότοπα, π.χ. ^{13}C ή 2H , 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 γαλακτώμα 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 αραιώσης, 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 στίβδα 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.
- 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 επαναληφμένη 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 σιφόνιο 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 μετάγχιση 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 βάρους 0,5 έως 2,5 cm στη μεσοπιφάνεια νερού/οκτανόλης-1. Η ταχύτητα ανάδευσης θα πρέπει να μειώνεται εάν το βάθος του στρόβιλου 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.

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 εμφανίζεται 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 μ l) 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_D/C_V 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 πληροφωρία 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.

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:

$$\log P_{OW,Av} = (\sum w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\sum w_i)^{-1}$$

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 $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log P_{OW,Av}}$), 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 ($\text{var}_{\log P_{OW,Av}}$) ως εξής:

$$\text{var}_{\log P_{OW,Av}} = (\sum w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\sum w_i \times (n - 1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{OW,Av}} = (\text{var}_{\log P_{OW,Av}})^{0,5}$$

Το σύμβολο n παριστά τον αριθμό των πειραματικών μονάδων.

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 δραστηριότητα (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,
- προσδιοριζόμενες 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,
- σύζηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων,
- 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).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- (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 A.8 του παρόντος παραρτήματος: Συντελεστής κατανομής.
- (3) Κεφάλαιο A.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.
 - (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.
-

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.
- Συγκέντρωση των ελεγχόμενων ουσιών = $0,7 \times$ 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

Συνολική μάζα ελεγχόμενης ουσίας (mg)	$Mass_{oct}/Mass_{water}$	$Mass_{H_2O}$ (mg)	$Conc_{H_2O}$ (mg/l)	$Mass_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333

Συνολική μάζα ελεγχόμενης ουσίας (mg)	Mass _{oct} /Mass _{water}	Mass _{H2O} (mg)	Conc _{H2O} (mg/l)	Mass _{oct} (mg)	Conc _{oct} (mg/l)
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 H₂O 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.

Ανασκόπηση των απαιτούμενων όγκων ως συνάρτηση της υδατοδιαλυτότητας και του λογαρίθμου του P_{ow}

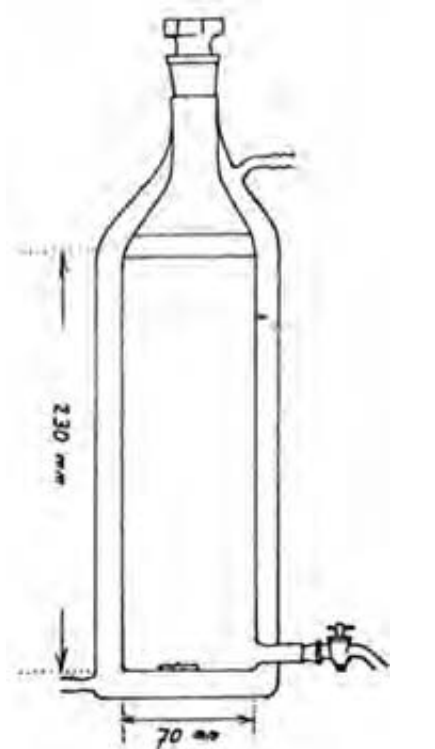
Ελάχιστος απαιτούμενος όγκος για τη φάση H₂O σε κάθε συγκέντρωση LOD (ml)

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

log P _{ow}	S _w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
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
	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 χιτόνιο για τον προσδιορισμό του P_{OW} με πείραμα αργής ανάδευσης



3. Το κεφάλαιο B.2 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«B.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 B.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 LC₅₀ 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 συγκέντρωση (LC₅₀), η μη θανατηφόρα οριακή συγκέντρωση (π.χ. LC₀₁) 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 (AEG_L), 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 B.52 του παρόντος παραρτήματος (4) [βλέπε GD 39 (2)]. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών B.2 δεν προορίζεται ειδικά για τον έλεγχο εξειδικευμένων υλικών, όπως δυσδιάλυτων ισομετρικών ή ιωδών 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 B.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 δυναμική έκθεση του ανθρώπου, τα διαθέσιμα δεδομένα (Q)SAR και τοξικολογικά δεδομένα για δομικά συγγενείς ουσίες [βλέπε GD 39 (2)].
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 B.40 (5) και B.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 B.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. LC₅₀, LC₀₁ 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 βανάουσα 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 σημειώνονται 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.

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 ακνητοποίησης. 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 ζών 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

- 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 πειραματόζων 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

- 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.
- 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.

Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

- 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.

Παρασκευάσμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε φορέα

- 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

- 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

- 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.

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 πιηκτικότητας 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 επιλεγείσα 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 προσμειξεων. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί, μεταξύ άλλων, από τα ακόλουθα δεδομένα: χρόνος κατακράτησης και σχετικό εμβαδόν κορυφής, μοριακό βάρος μέσω αναλύσεων φασματομετρίας μάζας ή αεροχρωματογραφίας ή άλλες εκτιμήσεις. Παρόλο που η ταυτότητα του δοκιμίου δεν αποτελεί ευθύνη του εργαστηρίου, θα ήταν σκόπιμο να επιβεβαιώνεται 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, 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 αερολύματα). 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/φουσαλιδοδείκτης, 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 ανηχνευθούν σε ατμόσφαιρα ατμών σωματίδια με δυναμικό σχηματισμού μικτών 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)].

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 τόσο 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 δυνητικών 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 απαραίτητων συνθηκών θαλάμου για μια οριακή δοκιμή.

31. Εάν παρατηρούνται θνησιμότητα ή ετοιμοθάνατα ζώα στην οριακή συγκέντρωση, τα αποτελέσματα της οριακής δοκιμής μπορούν να χρησιμοποιηθούν 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 προσαρμόσει 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 εξηγεί 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 LC₅₀, αλλά το πρωτόκολλο C × t γενικά υπερφέρει στην παροχή ανθεκτικών τιμών LC₀₁ και LC₁₀ (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).

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 διαδεσμένες 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 δυνητικών 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 απαραίτητων 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.

Κυρίως μελέτη: πρωτόκολλο $C \times t$

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 $C \times t$ 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 $\sqrt{2}$), επαρκούν για τον προσδιορισμό της σχέσης θνησιμότητας $C \times t$ (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 $C \times t$, 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 συνδεδεμένη με την ελεγχόμενη χημική ουσία, η οποία θα επέβαλλε πρόωγη θανάτωση των ζώων. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι αρχές και τα κριτήρια που συνοψίζονται στο έγγραφο καθοδήγησης για τα λιγότερο βίαια 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 συστηματικών επιδράσεων. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην παρατήρηση τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κόπωσης. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του ορθού μπορεί να παρέχει υποστηρικτικά αποδεικτικά στοιχεία αντανάκλαστικής 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 μείωση του κατά $\geq 20\%$ σε σύγκριση με τις τιμές πριν από τη μελέτη θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά. Τα επίζοντα ζώα ζυγίζονται και θανατώνονται με ευθανασία στο τέλος της περιόδου μετά την έκθεση.

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 autólυση. Η νεκροψία θα πρέπει να διενεργείται όσο το δυνατόν συντομότερα, κατά κανόνα εντός μιας ή δύο ημερών. Όλες οι μικροσκοπικές 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 επιγύων 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, στρωμή, θερμοκρασία και σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, φωτοπερίοδος και προσδιορισμός του σιτηρεσίου,
- είδος/φυλή που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της χρήσης άλλου είδους πέραν του επίμου,
- 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 υγιεινότητας 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 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,
- όλες οι ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αναφέρονται σε μονάδες μάζας (π.χ. mg/l, mg/m³ 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. LC₅₀, LD₀₁), συμπεριλαμβανομένων των ορίων εμπιστοσύνης 95 % και της κλίσης (αν παρέχεται από τη μέθοδο αξιολόγησης),
- στατιστική σχέση, συμπεριλαμβανομένης εκτίμησης για τον εκθέτη n (πρωτόκολλο $C \times t$). Θα πρέπει να αναφέρεται το όνομα του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε.

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 βίαια καταληκτικά σημεία (8),
- εάν διακόπηκε η διεξαγωγή δοκιμών βάσει του κεφαλαίου B.52 του παρόντος παραρτήματος (4) και προτιμήθηκε η παρούσα μέθοδος δοκιμών B.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 B.52 του παρόντος παραρτήματος: Οξεία αναπνευστική τοξικότητα — Μέθοδος των κλάσεων οξείας τοξικότητας (ATC).

- (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.
- (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.

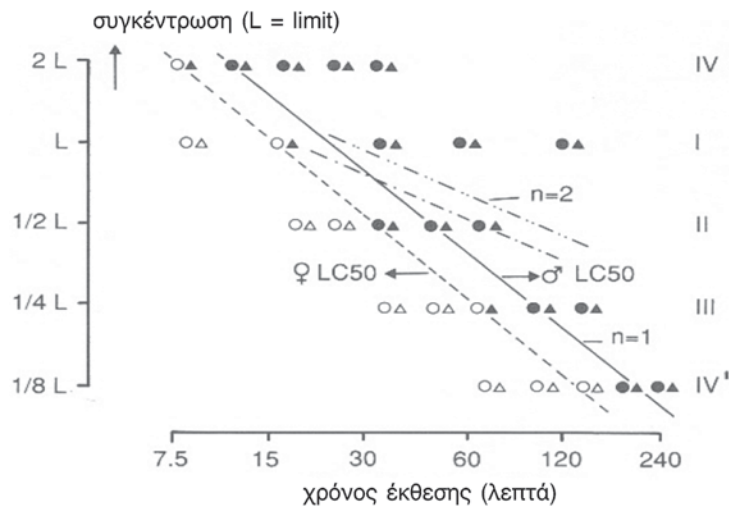
Προσάρτημα 1

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 εκδόσεις 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 επίμεις 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 πεθαίνουν 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).
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 επίμους



Λευκά σύμβολα = επιζώντα ζώα· μαύρα σύμβολα = νεκρά ζώα

Τρίγωνα = θηλυκά· κύκλοι = αρσενικά

Συνεχής γραμμή = τιμές LC₅₀ (εύρος 7,5-240 λεπτά) για αρσενικά ζώα με n = 1

Διακεκομμένη γραμμή = τιμές LC₅₀ (εύρος 7,5-240 λεπτά) για θηλυκά ζώα με n = 1

Γραμμή με κουκίδες = υποθετικές τιμές LC₅₀ για αρσενικά και θηλυκά ζώα, εάν n = 2 (12)

Γλωσσάριο

συγκέντρωση:

χρόνος έκθεσης:

10. Ακολουθώς παρατίθεται παράδειγμα της κλιμακωτής διαδικασίας:

Συνοδρία 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.

↓

Συνοδρία έκθεσης II ^(γ) — Κυρίως μελέτη

- 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

^(α) Εάν δεν υπάρχουν πληροφορίες για ευαισθησία ανάλογα με το φύλο, χρησιμοποιούνται επίμους και των δύο φύλων, ήτοι 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση. Βάσει των διαθέσιμων πληροφοριών ή εάν καταστεί προφανές κατά τη συγκεκριμένη συνοδρία 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 συνοδρία έκθεσης.

— Πέντε ομάδες ζών εκτίθενται σε χαμηλότερη συγκέντρωση ^(θ) (1/2L) για ελαφρώς μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή $\sqrt{2}$: βλέπε σχήμα 1).

↓

Συνεδρία έκθεσης III — Κυρίως μελέτη

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

— Πέντε ομάδες ζών εκτίθενται σε χαμηλότερη συγκέντρωση ^(θ) (1/4L) για ελαφρώς μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή $\sqrt{2}$: βλέπε σχήμα 1).

↓

Συνεδρία έκθεσης IV' — Κυρίως μελέτη

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

— Πέντε ομάδες ζών εκτίθενται σε χαμηλότερη συγκέντρωση ^(θ) (1/8L) για ελαφρώς μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή $\sqrt{2}$: βλέπε σχήμα 1).

↓ ή

Συνεδρία έκθεσης IV — Κυρίως μελέτη

— 1 ζώο/φύλο ανά συγκέντρωση/χρονική στιγμή· 10 ζώα συνολικά.

— Πέντε ομάδες ζών εκτίθενται σε υψηλότερη συγκέντρωση ^(ε) (2L) για ελαφρώς μικρότερες περιόδους έκθεσης (που απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή $\sqrt{2}$: 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:

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

όπου C = συγκέντρωση και t = διάρκεια έκθεσης ή

Εξίσωση 2:

$$\text{Response} = f(C^n t)$$

όπου $n = b_1/b_2$.

Από την 1η εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί η τιμή LC₅₀ 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 LC₀₁ μπορεί να υπολογιστεί με τη χρήση P = 2,67.

^(θ) 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 κλίμακα, με γεωμετρική πρόοδο των περιόδων έκθεσης με λόγο 1,4 ($\sqrt{2}$: 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 ιδιαίτερος 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 ιδιαίτερος να προσαρμόζονται αναλόγως οι επόμενες συγκεντρώσεις και περίοδοι.

^(ε) Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να αυξηθεί η συγκέντρωση (2L) σε ένα νέο εύρος χρόνου, και πάλι με λεπτότερη κλίμακα, με γεωμετρική πρόοδο των περιόδων έκθεσης με λόγο 1,4 ($\sqrt{2}$) 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.»

4. Τα κεφάλαια Β.7 και Β.8 αντικαθίστανται από το ακόλουθο κείμενο:

«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 δραστηριότητας 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 συχετισμό 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.
5. Το διεθνές πρόγραμμα που εφαρμόστηκε με σκοπό την επικύρωση παραμέτρων κατάλληλων για τη δυνητική ενδεχόμενη ανίχνευση της ενδοκρινικής δραστηριότητας 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 ή ισχυρή επίδραση στη λειτουργία του θυρεοειδούς, καθώς και ουσίες με ισχυρή και μέτρια ενδοκρινική δραστηριότητα, οι οποίες δρουν μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων ή ανδρογόνων. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν κατέστη δυνατός ο εντοπισμός ενδοκρινικών δραστικών ουσιών που προσβάλλουν ασθενώς τους υποδοχείς οιστρογόνων ή ανδρογόνων. Συνεπώς, η μέθοδος δεν μπορεί να περιγραφεί ως δοκιμασία διαλογής για ενδοκρινική δραστηριότητα.
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 δραστηριότητας. Για τον λόγο αυτό, η λήψη κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με την ενδοκρινική δραστηριότητα (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, 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 $\pm 20\%$ 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 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). 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 $50\text{-}60\%$. 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 πρόσμεξης 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 προσμειξεις. 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 καθέθρα 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.
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 διεξαχθεί 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 σιτηρέσιου 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 υψηλότερου επιπέδου δόσης.

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 σιτηρέσιου 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 σιτηρέσιου, 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 περιεργής 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.
28. Οι παρατηρήσεις των λειτουργιών κατά την τέταρτη εβδομάδα έκθεσης μπορούν να παραλείπονται, εάν η μελέτη εκπονείται ως προκαταρκτικό 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 κοιλικών 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 ηκτικότητας 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 σωματία Heinz.
33. Τα δείγματα αίματος πρέπει να λαμβάνονται από καθορισμένο σημείο ακριβώς πριν από τη θανάτωση των ζώων ή κατά τη διάρκεια 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 θανάτωση τους ζώων ή κατά τη διάρκεια 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 αμινοτρανσφεράση, 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.

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 προσβάλλουν, ή υπάρχουν υπόνοιες ότι προσβάλλουν, τα μεταβολικά χαρακτηριστικά αφορούν το ασβέστιο, τα φωσφορικά άλατα, τα τριγλυκερίδια, ειδικές ορμόνες και τη χολινστεράση. 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 συγκεκριμένη 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 δυνατόν 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 στομιών, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Ήπαρ, νεφρά, επινεφρίδια, όρχεις, επιδιδυμίδες, προστάτης + σπερματοδόχες κύστες 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 προσφύμενους ιστούς και να ζυγίζονται για τον προσδιορισμό του υγρού βάρους, το ταχύτερο δυνατόν μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρασή τους. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τον καθαρισμό του συμπλεγματος του προστάτη, ώστε να μην προκαλείται διάτρηση των σπερματοδόχων κύστεων που είναι πλήρεις υγρού. Εναλλακτικά, οι σπερματοδόχες κύστες και ο προστάτης μπορούν να καθαρίζονται από ιστούς και να ζυγίζονται μετά τη μονιμοποίηση.
41. Επιπλέον, δύο άλλοι ιστοί μπορούν να ζυγίζονται προαιρετικά, το συντομότερο δυνατόν μετά την ανατομή, ώστε να αποφεύγεται η ξήρασή 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), νοτιαίος μυελός, οφθαλμοί, στομάχι, λεπτό και παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων των Παυέριων πλακών), ήπαρ, νεφρά, επινεφρίδια, σπλήνα, καρδιά, θύμος αδένας, θυρεοειδής αδένας, τραχεία και πνεύμονες (διατηρημένοι με εμφύσηση μονιμοποιητικού υλικού, ακολουθούμενη από εμφύσηση), γεννητικοί αδένες (όρχεις και ωοθήκες), άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος της μήτρας, επιδιδυμίδες, προστάτης + σπερματοδόχες κύστες με τους πηκτικούς αδένες), κολπική κοιλότητα, ουροδόχος κύστη, λεμφαδένες [πέραν του πλέον άμεσου αδένος 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 μύς και οστό με μυελό των οστών (τομή ή, εναλλακτικά, πρόσφατο παρασκεύασμα αναρροφηθέντος μυελού). Συνιστάται να μονιμοποιούνται οι όρχεις με εμφύσηση σε μονιμοποιητικό υλικό Bouin ή τροποποιημένο μονιμοποιητικό υλικό Davidson (16) (17). Ο ινώδης χιτώνας (tunica albuginea) πρέπει να διατηρείται 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 ωθήκες), άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (μήτρα και τράχηλος της μήτρας, επιδιδυμίδες, σπερματοδόχες κύστες με τους πηκτικούς αδένες, ραχαιοπλαγίος 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 ανεπαίθητες 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 ωθηκών (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.

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 διαταρακών. 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,
- 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*

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

ΝΟΑΕΛ 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 δράτικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση μιας φυσικής θυρεοειδικής ορμόνης (π.χ. T₃) 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 δρατικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική θυρεοειδική ορμόνη (π.χ. T₃) στον οργανισμό θηλαστικού.

Οιστρογονικότητα είναι η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως μια φυσική οιστρογόνος ορμόνη (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) στον οργανισμό θηλαστικού.

Προσάρτημα 2

Συνιστώμενα καταληκτικά σημεία για την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών στην παρούσα μέθοδο δοκιμών B.7

Υποχρεωτικά καταληκτικά σημεία	Προαιρετικά καταληκτικά σημεία
Βάρος	
<ul style="list-style-type: none"> — Όρχεις — Επιδιδυμίδες — Επινεφρίδια — Προστάτης + σπερματοδόχες κύστες με τους πηκτικούς αδένες 	<ul style="list-style-type: none"> — Ωοθήκες — Μήτρα, συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου της — Θυρεοειδής
Ιστοπαθολογία	
<ul style="list-style-type: none"> — Γεννητικοί αδένες: <ul style="list-style-type: none"> — όρχεις και — ωοθήκες — Άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος: <ul style="list-style-type: none"> — επιδιδυμίδες, — προστάτης + σπερματοδόχες κύστες με τους πηκτικούς αδένες, — μήτρα, συμπεριλαμβανομένου του τραχήλου της — Επινεφρίδια — Θυρεοειδής — Κόλπος 	<ul style="list-style-type: none"> — Κολπικά επιχρίσματα — Αρσενικοί μαστικοί αδένες — Υπόφυση
Μέτρηση ορμονών	
	<ul style="list-style-type: none"> — 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.
- (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, Warbritton 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.

B.8. ΥΠΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ 28 ΗΜΕΡΩΝ

ΣΥΝΟΨΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών B.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 B.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 B.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 ναοιλικών. 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.
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 βίαια 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 τυχαίωσης, τα ζώα πρέπει να είναι νεαρά ενήλικα, ηλικίας 7 έως 9 εβδομάδων. Η διακύμανση των βαρών σώματος πρέπει να είναι ± 20 % του μέσου βάρους των ζώων κάθε φύλου. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σηματοδοτούνται 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.

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 ιδιαίτερος 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).
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 (T₃, T₄), προκειμένου για θυρεοτοξικές ουσίες, πρωτεΐνες, LDH ή ουδετερόφιλα 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 ριζικής έκθεσης άλλων ειδών τρωκτικών εκτός των επιμύων, οι μέγιστες περιόδους 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).

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 επιλεγείσα 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.

Παρασκευάσμα 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 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, μέθοδο 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 πιπιτικότητας 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 εξαχθούν, 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.).
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 $\pm 10\%$, προκειμένου για αέρια και ατμούς, και $\pm 20\%$ 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 (αέρια/ατμοί και αερολύματα). 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 καταμετρητής 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/φουσαλιδοδείκτης, 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 αβέβια δεδομένα που ενδέχεται να οδηγήσουν 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 αερολυμάτων 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 ενδείκνυται 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.
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 αντανάκλαστικής βραδυπνοίας ή υποθερμίας/υπερθερμίας που σχετίζεται με την αγωγή ή τη στέρση 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 συστηματικής 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 διεύθυντής της μελέτης μπορεί να επιλέξει να αξιολογήσει πρόσθετες παραμέτρους για τον καλύτερο χαρακτηρισμό της τοξικότητας μιας χημικής ουσίας (π.χ. χολινεστεράση, λιπίδια, ορμόνες, οξοξασική ισορροπία, μεθαιμοσφαιρίνη ή σωματία Heinz, κίνηση 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

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
Αζωτο ουρίας αίματος	Κάλιο
Ολική χολερυθρίνη	Νάτριο
Κρεατινίνη	Ασβέστιο
Ολικές πρωτεΐνες	Φωσφόρος
Αλβουμίνη	Χλωριούχα άλατα
Σφαιρίνη	
Ανάλυση ούρων (προαιρετική)	
Όψη (χρώμα και θολρότητα)	Ολικές πρωτεΐνες
Όγκος	Γλυκόζη
Ειδικό βάρος ή ωσμωτικότητα	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 ολονύκτια 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 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).

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 αφαιμάξη (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 ауτολύση. Η νεκροψία θα πρέπει να εκτελείται το ταχύτερο δυνατόν, κατά κανόνα εντός μιας ή δύο ημερών. Όλες οι μικροσκοπικές παθολογικές αλλοιώσεις θα πρέπει να καταγράφονται για κάθε ζώο, με ιδιαίτερη προσοχή σε τυχόν αλλοιώσεις της αναπνευστικής οδού.
40. Στον πίνακα 2 εμφανίζονται 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 θυροειδής 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 κύστες
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
[Οφθαλμοί (αμφιβληστροειδής, οπτικό νεύρο) και βλέφαρα]	Στομάχι
Καρδιά	Όρχεις
Νεφροί	Θύμος
Λάρυγγας (3 επίπεδα, 1 επίπεδο πρέπει να περιλαμβάνει τη βάση της επιγλωττίδας)	Θυροειδής
Ήπαρ	Τραχεία (τουλάχιστον 2 επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης 1 διαμήκου τομής μέσω της τρόπιδας και 1 εγκάρσιας τομής)
Πνεύμονας (όλοι οι λοβοί σε ένα επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων των κυρίων βρόγχων)	[Ουροδόχος κύστη]
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.	Μήτρα
Ρινοφαρυγγικοί ιστοί (τουλάχιστον 4 επίπεδα· 1 επίπεδο πρέπει να περιλαμβάνει τον ρινοφαρυγγικό πόρο και τον λεμφικό ιστό που συνοδεύει τη ρινική κοιλότητα (NALT).	Όλοι οι ιστοί με μακροσκοπικές αλλοιώσεις
Οισοφάγος	
[Οσφρητικός βολβός]	
Ωοθήκες	

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 διαμήκου τομής, μέσω της τρόπιδας, της διακλάδωσης των εξοπνευστικών βρόγχων 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 χρησιμοποιηθεί 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,
- 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 προετοιμασιών πριν από τον έλεγχο, συμπεριλαμβανομένων του σιτηρεσίου, της περιόδου υγιονομικής 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,
- 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/m³ 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),
- πίνακας με το βάρος κάθε ζώου,
- πίνακας με την κατανάλωση τροφής,
- πίνακας με τα δεδομένα κλινικής παθολογίας,
- ευρήματα νεκρωσίας 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 βίαια καταληκτικά σημεία (3).
- Θα πρέπει να προσδιορίζονται τα όργανα-στόχοι.
- Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι τιμές NOAEL και LOAEL.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- (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.

-
- (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).
-

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.»

5. Τα κεφάλαια B.29 και B.30 αντικαθίστανται από το ακόλουθο κείμενο:

«B.29. ΥΠΟΧΡΟΝΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ

ΣΥΝΟΨΗ

Η παρούσα αναθεωρημένη έκθεση δοκιμής B.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, βροχοκυψελιδικό 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 B.29 [όντας ισοδύναμη της αναθεωρημένης TG 413 (2009)] έχει επικαιροποιηθεί ώστε να αντανάκλα 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 ναούλικών. 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 παρατηρηθεί 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.
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 βίαια 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 $\pm 20\%$ του μέσου βάρους κάθε φύλου. Τα ζώα επιλέγονται τυχαία, σηματοδοτούνται 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 στήθρα, εκτός από την περίοδο έκθεσης, συνοδευόμενα από απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού από το δικτυο ύδρευσης. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός, με φωτοπερίοδο 12 ωρών.

Θάλαμοι εισπνοής

9. Κατά την επιλογή θάλαμου 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 επιφθική συγκέντρωση, 2) το επίπεδο έκθεσης του ανθρώπου βάσει του "χειριστού 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)· βλ. εγγραφο GD 39 (2). Τυχόν υπέρβαση των ορίων αυτών κατά τον έλεγχο αερίων ή ιδιαίτερως 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 προσδοκίων 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).
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 (T₃, T₄) για θυρεοτοξικές ουσίες, πρωτεΐνη, LDH ή ουδετερόφιλα 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 συστηματικής 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.

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 ιδιαίτερος 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 προδιορίζεται 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 εμπειρογνομosύνη. Παραδείγματος χάριν, σωματίδια μεταλλικών καπνών μπορεί να υπολείπονται του προτύπου αυτού, ενώ φορτισμένα σωματίδια και ίνες ενδέχεται να το υπερβαίνουν.

Παρασκευάσμα 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 μια 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, μέθοδο 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 πιητικότητας 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 ανάλυση. Ωστόσο, απαιτούνται γι' 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 επιλεγείσα 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 προσμειξέων. 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 κλπ.)
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 $\pm 10\%$, προκειμένου για αέρια και ατμούς, ή $\pm 20\%$, 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 επιλεγεί τουλάχιστον μία ουσία δείκτης (αναλύτης), συνήθως το κύριο δραστικό συστατικό του μείγματος, από κάθε φάση (αέριο/ατμός και αερολύμα). 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.
30. Παράλληλα με το κύριο όργανο θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια δεύτερη συσκευή, όπως ένα σταθμικό φίλτρο ή πλυντρίδα αερίου/φουσαλιδοδείκτης, 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 αβέβια 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 ενδείκνυται 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 κόπωσης. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του ορθού μπορεί να παρέχει υποστηρικτικά αποδεικτικά στοιχεία αντανάκλαστικής 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.

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 σωματίνα Heinz, κίνηση της κρεατινής, 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 ωσμωτικότητα	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).	

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 πειρατόζωα, συμπεριλαμβανομένων των θανόντων κατά τη διάρκεια της δοκιμής και εκείνων που αποσύρθηκαν από τη μελέτη για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, υποβάλλονται σε πλήρη αφαιμάξη (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 autolysis. 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 ωπή κατάσταση το συντομότερο δυνατό μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρασή 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.

Πίνακας 2

Διατηρούμενα όργανα και ιστοί κατά τη νεκροψία

Επινεφρίδια	Οισοφάγος
Αορτή	[Οσφρητικός βολβός]
Μυελός των οστών (και/ή πρόσφατα αναρροφηθείς μυελός των οστών)	Θυλάκες
Εγκέφαλος (συμπεριλαμβανομένων τομών του εγκεφάλου, της παρεγκεφαλίδας και του προμήκη μυελού/της γέφυρας)	Πάγκρεας
Τυφλό έντερο	Παραθυροειδείς
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)	Θυροειδείς 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]
Λεμφαδένες (σε απόσταση από το σημείο εισόδου)	Τραχεία (τουλάχιστον 2 επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης 1 διαμήκους τομής μέσω της τρόπιδας και 1 εγκάρσιας τομής)
Μαστικός αδένας (θηλυκά ζώα)	[Ουρητήρας]
Μυς (μηρός)	[Ουρήθρα]
Ρινοφαρυγγικοί ιστοί (τουλάχιστον 4 επίπεδα: 1 επίπεδο πρέπει να περιλαμβάνει το ρινοφαρυγγικό πόρο και τον λεμφικό ιστό που συνοδεύει τη ρινική κοιλότητα (NALT).	Ουροδόχος κύστη
	Μήτρα
	Όργανα-στόχοι
	Όλες οι μακροσκοπικές βλάβες και μάζες

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 έκπληξης 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 διαμήκου 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 συσχέτισμός 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, στρωμή, θερμοκρασία και σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, φωτοπερίοδο και προσδιορισμό του σιτηρεσίου,
- 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 στέρισης 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,
- 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/m³ 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),
- 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 βάνουσα 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.
 - (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., Hamelers 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).
-

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

B.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 B.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 B.30 διενεργήθηκε παράλληλα με τις αναθεωρήσεις του κεφαλαίου B.32 “Μελέτες καρκινογενετικότητας” και του κεφαλαίου B.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 B.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 B.8 (8) και το κεφάλαιο B.29 (9) του παρόντος παραρτήματος, καθώς και το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (7), θα πρέπει να λαμβάνονται ιδιαίτερος υπόψη κατά τον σχεδιασμό πιο μακροπρόθεσμων μελετών που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού. Το κεφάλαιο B.9 του παρόντος παραρτήματος (10) θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερος υπόψη στην περίπτωση δοκιμών μέσω του δέρματος.
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).
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 βίαια 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 ιδιαίτερος σημαντικός στην περίπτωση που πρόκειται να διεξαχθεί συνδυασμένη μελέτη χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο Β.33 του παρόντος παραρτήματος) (παράγραφος 11).
11. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο Β.33 του παρόντος παραρτήματος) αντί μιας μελέτης χρόνιας τοξικότητας (η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.30) και μιας μελέτης καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο Β.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 Β.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 περιόδους ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις (βλέπε παράγραφο 33). Η διάρκεια αυτή επιλέγεται να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να επιτρέπει 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 πρόωγες 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 επίζησει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

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 B.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 συνηθών 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 (\pm 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 να ανταποκρίνεται σε όλες τις διατροφικές απαιτήσεις των ειδών που υποβάλλονται στη δοκιμή και η περιεκτικότητα σε τροφικές προσμειξεις, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, υπολειμμάτων ζιανιοκτόνων, ανθρακικών 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 προσμειξεων 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 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 \pm 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 μικροτσιπ 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 αθνελαίας, 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 προβλέπεται 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.
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 εξωτερικών 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 κλπ.,
 - περιοχές στην καμπύλη δόσης-απόκρισης στις οποίες απαιτείται μια ιδιαίτερως 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.

27. Εάν αναμένεται, βάσει πληροφοριών από προκαταρκτικές μελέτες, ότι μια δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης, ισοδύναμη 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 υψηλότερου επιπέδου 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 ζιανιοκτόνων, 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 αποφευχθούν 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.
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 περιόδους 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. Εξαιρέση 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.
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 κλινικών ή τοπικών κινήσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση του εαυτού τους, συνεχείς περιστροφές) ή περιέργης συμπεριφοράς (όπως αυτοακρωτηριασμός, βάδισμα προς τα πίσω) (24).
36. Η οφθαλμολογική εξέταση, με χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισόδυναμου 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.

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 σωματίνα 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 ενδεικνύεται 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.
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 εμπειρογνομόνων 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 στομιών, 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 ζώων, εκτός αυτών που εξαιρούνται βάσει του τελευταίου μέρους της παραγράφου 45. Τα επινεφρίδια, ο εγκέφαλος, οι επιδιδυμίδες, η καρδιά, οι νεφροί, το ήπαρ, οι ωθήκες, η σπλήνα, οι όρχις, ο θυροειδής (ζυγίζεται μετά τη μονιμοποίηση μαζί με τους παραθυροειδείς) 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	ειλέος	παραθυροειδής 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	δακρυγόνο αδένας (εξωβολβικός)	προστάτης	θυροειδής
τράχηλος της μήτρας	ήπαρ	ορθό	[γλώσσα]

πηκτικός αδένας	πνεύμονας	σελογόνος 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 ανατιμηθεί, 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 επίμου)	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 B.8 (8) και 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 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.

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 εμφάνισης 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,
- 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.

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

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- (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 Multi-sector 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.
- (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 Routine Assessment 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.
 - (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.
-

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.»

6. Τα κεφάλαια B.32 και B.33 αντικαθίστανται από το ακόλουθο κείμενο:

«B.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 B.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 B.32 διενεργήθηκε παράλληλα με τις αναθεωρήσεις του κεφαλαίου B.30 “Μελέτες χρόνιας τοξικότητας” και του κεφαλαίου B.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 B.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 B.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 του δέρματος (7) και μέσω της αναπνευστικής οδού (7)(8). Τα κεφάλαια B.8 (9) και B.29 (10) του παρόντος παραρτήματος, καθώς και το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (8), θα πρέπει να λαμβάνονται ιδιαίτερος υπόψη κατά τον σχεδιασμό πιο μακροπρόθεσμων μελετών που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού. Το κεφάλαιο B.9 του παρόντος παραρτήματος (11) θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερος υπόψη στην περίπτωση δοκιμών μέσω του δέρματος.
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 συσώρευσης. Παρέχει εκτίμηση του μεγίστου επιπέδου στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς τοξικές επιδράσεις και, στην περίπτωση μη γονιδοτοξικών 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 πειραματόζων 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 ιδιαίτερες 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 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 ανανώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών ενδείξεων ως λιγότερο βάνουσα 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 ιδιαίτερος σημαντικό στην περίπτωση που πρόκειται να διεξαχθεί συνδυασμένη μελέτη χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο Β.33 του παρόντος παραρτήματος) (παράγραφος 12).
12. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο διεξαγωγής συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας και καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο Β.33 του παρόντος παραρτήματος) αντί μιας μελέτης χρόνιας τοξικότητας (κεφάλαιο Β.30 του παρόντος παραρτήματος) και μιας μελέτης καρκινογενετικότητας (η παρούσα μέθοδος δοκιμών Β.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 Β.33 του παρόντος παραρτήματος), ενώ είναι γνωστό επίσης ότι ενδέχεται να απαιτούνται χωριστές μελέτες βάσει ορισμένων κανονιστικών πλαισίων.

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 πειραματόζων για το μεγαλύτερο διάστημα της ζωής τους, συνήθως μέσω της στοματικής οδού. Ενδέχεται να ενδείκνυται 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 πειραματόζων θα πρέπει να είναι 22 °C (\pm 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, ανθρακικών 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 πρόσμεξης 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 \pm 20 % του μέσου βάρους όλων των ζώων της μελέτης, χωριστά για κάθε φύλο. Τα ζώα πρέπει να κατατάσσονται 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 μικροτσιπ 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).

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 εξωτερικών 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 ιδιαίτερος 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 φυσικές 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.
30. Στην περίπτωση χορήγησης από το στόμα, χορηγούνται στα ζώα δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας καθημερινά (επί 24 ώρες την εβδομάδα), συνήθως για μια περίοδο 24 μηνών στην περίπτωση τρωκτικών (βλέπε επίσης παράγραφο 32). Θα πρέπει να αιτιολογείται οποιοδήποτε άλλο καθεστώς δόσολογίας 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 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 περιόδους 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).
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 δόσολογία 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 τροκτικά, 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 ποτικών, 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.

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, 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 στομιών, 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.

37. Οι ακόλουθοι ιστοί πρέπει να διατηρούνται στο καταλληλότερο μοιμοποιητικό 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	ειλός	παραθυροειδής 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	θυροειδής
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 ανατιμηθεί, 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]
[μυριαίο οστό μαζί με την άρθρωση]	[οσφρητικός βολβός]	σπλήνα	κόλπος
χοληδόχος κύστη (για άλλα είδη εκτός του επίμου)	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 B.8 και B.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.

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,
- 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).

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,
- συστηματικός 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.
- (6) Κεφάλαιο Β.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 Β.8 του παρόντος παραρτήματος: Υποξεία αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 28 ημερών.
- (10) Κεφάλαιο Β.29 του παρόντος παραρτήματος: Υποχρόνια αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 90 ημερών.
- (11) Κεφάλαιο Β.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.
- (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.
-

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

B. 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 B.33 ώστε να αντανάκλα 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 B.33 διενεργήθηκε παράλληλα με τις αναθεωρήσεις του κεφαλαίου B.32 “Μελέτες καρκινογενετικότητας” και του κεφαλαίου B.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 B.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 καθυστερώσεων, 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 B.8 (9) και B.29 (10) του παρόντος παραρτήματος, καθώς και το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές οξείας αναπνευστικής τοξικότητας (8), θα πρέπει να λαμβάνονται ιδιαίτερος υπόψη κατά τον σχεδιασμό πιο μακροπρόθεσμων μελετών που περιλαμβάνουν έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού. Το κεφάλαιο B.9 του παρόντος παραρτήματος (11) θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερος υπόψη στην περίπτωση δοκιμών μέσω του δέρματος.
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 πειραματόζων 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 ιδιαίτερες 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 μεταλλαξιογένεσης/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 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 βέλτιστα 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 ιδιαίτερος 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 B.30 του παρόντος παραρτήματος) και μιας μελέτης καρκινογενετικότητας (κεφάλαιο B.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).
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 περιόδους, 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 επίζησει 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 B.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.

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 (\pm 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 προμείξεις, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, υπολειμμάτων ζιανιοκτόνων, ανθρακικών 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 προμεξέων 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 $\pm 20\%$ του μέσου βάρους όλων των ζώων της μελέτης, χωριστά για κάθε φύλο. Τα ζώα πρέπει να κατανέμονται τυχαία σε ομάδες μάρτυρων 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 δερματοστιξίας, εμφυτεύματος μικροτσιπ 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 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 Β.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 αμφοτέρως 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.

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, ισοδύναμη 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 υψηλότερου επιπέδου 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, παραδειγματος 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 εξωτερικών 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 ιδιαίτερος 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 σιτηρεσίου 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.
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 δόσης 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 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 περιόδους 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).
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 δόσολογία 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. Εξαιρέση αποτελούν οι ενδοχοιμώδεις 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 κατανομούνται 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).

- 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 θνησιμότητα 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 έκδοση (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 περιέργη 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.
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 σωματίνα 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 ευελικτη 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 ενδεικνύεται 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 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 ευελικτη 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 εμπειρογνομόνων 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 στομιών, 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 συγκαλύπτουν 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.

48. Θα πρέπει να μετράται το βάρος των οργάνων όλων των ζώων, 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 όρχις, 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 και/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 ανατιμηθεί, 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			

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 (9) και του κεφαλαίου B.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.

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 στομιών, 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, επαφιόμενη 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	παραθυροειδής 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	θυροειδής

τράχηλος της μήτρας	ήπαρ	ορθό	[γλώσσα]
πηκτικός αδένας	πνεύμονας	σιελόγόνος 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 ανατιμηθεί, 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 επίμου)	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.

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.

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,
- συσχέτισμος 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 Β.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 Β.8 του παρόντος παραρτήματος: Υποξεία αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 28 ημερών.
- (10) Κεφάλαιο Β.29 του παρόντος παραρτήματος: Υποχρόνια αναπνευστική τοξικότητα: μελέτη 90 ημερών.
- (11) Κεφάλαιο Β.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., 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 Multi-sector 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.
- (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 Routine Assessment 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.
-

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.»

7. Το κεφάλαιο B.36 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«B.36. ΤΟΞΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος είναι ισοδύναμη με την TG 417 (2010) του ΟΟΣΑ. Μελέτες που εξετάζουν την τοξικοκινητική (TK) 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 TK βοηθά στην κατανόηση των τοξικολογικών μελετών καταδεικνύοντας ότι τα πειραματόζωα εκτίθενται συστηματικά 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 συσώρευσης 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.
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 pK_a , 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 ναουλικών. Μια έκθεση σχετικά με την προκαταρκτική αναθεώρηση των κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών του ΟΟΣΑ σχετικά με τη δυνατότητα εφαρμογής τους σε ναουλικά καταδεικνύει ότι η TG 417 (ισοδύναμη της παρούσας μεθόδου δοκιμών B.36) δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε ναουλικά (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 βάνουση 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.

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 βάρων των ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ 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 πειραματόζων πρέπει να είναι $22\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^\circ\text{C}$) 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,

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 συγκεκριμένων 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 προσμειξιών που υπάρχουν σε ποσοστό 2 % ή υψηλότερο. Η καθαρότητα, καθώς και η ταυτότητα και η αναλογία τυχόν προσμειξιών 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.
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 συσώρευσης και/ή παραμονής. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται επαναλαμβανόμενη δόση i) για να αντιμετωπιστεί πληρέστερα το δυναμικό συσώρευσης 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 τις 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 πειραματόζων, 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 βάρους σώματος. Σε περίπτωση επαναλαμβανόμενης δόσης, όταν αντενδείκνεται 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 δόθηκε 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 παρασκευάσμα 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 σφαγιτίδα φλέβα (για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής 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 καθεμία 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:

Ποσοστιαία απορρόφηση = (ποσότητα σε χολή + ούρα + εκπνεόμενο αέρα + σφάγιο χωρίς τα περιεχόμενα του γαστρεντερικού συστήματος)/χορηγηθείσα ποσότητα × 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 (άδικτος ή διασωληνωμένος στο χοληδόχο πόρο επίμυ) (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.

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:

$$F = (AUC_{\text{exp}}/AUC_{\text{IV}}) \times (\text{Δόση}_{\text{IV}}/\text{Δόση}_{\text{exp}})$$

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 περιπλακει, 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 ερευνηθεί 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 οποιοδήποτε άλλο 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).

39. Είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός της ραδιενέργειας σε μελέτες ιστικής κατανομής, με ανατομή οργάνων, ομοιογενοποίηση, καύση και/ή διαλυτοποίηση, συνδεδεμένη από μέτρηση των παγιδευμένων καταλοίπων με απεριθμητή 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 παράγραφο 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 απεκκρίματων 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 φασματομετρία 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 στιβάδας αντίστροφη 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.

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 απεκκρίματων (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 απεκκρίματων 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 στον 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 CO₂ 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.
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 βιοσυσσωρευση 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 συσσωρευση 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·
 - 3) εάν τα αποτελέσματα μελετών ταυτοποίησης μεταβολιτών καταδεικνύουν ταυτοποίηση ενός δυναμικά τοξικού μεταβολίτη που ενδέχεται να έχει παραχθεί από ενζυμική οδό προκαλούμενη από την ελεγχόμενη χημική ουσία·
 - 4) κατά την εξήγηση 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 είδη 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 γλυκουρονοσουλ-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 καλλιιεργημένα 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 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 ενδοκυττάρου 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).
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 οποιονδήποτε 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 κθάαρσης 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 οδού 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).

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 βιοσυσώρευσης, 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 υπο-ενότητα 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 η 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.

- 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 μικρογραμμάτων ή χιλιοστόγραμμα 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.
 - 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, C_{max}, T_{max}, κθάραση, 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 οποιοδήποτε 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 κθάρασης, το δυναμικό βιοσυσσώρευσης και το επίπεδο καταλοίπων της μητρικής ένωσης και/ή των μεταβολιτών στους ιστούς, καθώς και πιθανές δόσοεξαρτώμενες 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.

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. αναραιώτο, 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 ασφαλίεται 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 βίανασο 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.

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 End-points 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 Β.45 του παρόντος παραρτήματος: Δερματική απορρόφηση: Μέθοδος in vitro.
- (7) IPCS (2010), Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic 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.
-

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 X 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 ανατομική 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 συστηματική 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 συστηματικό αίμα και στους ιστούς) μπορεί να προκύψει από χημική αποδόμηση, λόγω μεταβολισμού στο τοίχωμα του εντέρου 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 δόσολογίας (έκθεση) και η συσσωρευση 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.

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 ανατομική 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 πλάσμα 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 παραγώνων 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 (βασισμένη στη φυσιολογία τοξικοκινητική, βασισμένη στη φαρμακοκινητική, βασισμένη στη φυσιολογία φαρμακοκινητική, βασισμένη 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 στοχευόμενης χημικής ουσίας.

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.»

8. Προστίθεται το κεφάλαιο B.52:

«B.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 B.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 B.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 βάνουσο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται η ταλαιπωρία τους. Κατευθύνσεις για τα μη βάνουσα 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 LC₅₀ ή αναλύσεις συγκέντρωσης-απόκρισης, το κεφάλαιο B.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 ιδιαίτερας ερεθιστικής τους δράσης, δεν πρέπει να ελέγχονται με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών [βλέπε έγγραφο GD 39 (8)].

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Η δοκιμή βασίζεται σε μια βαθμιδωτή διαδικασία 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 βίαια 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 $\pm 20\%$ του μέσου βάρους για κάθε φύλο οποιωνδήποτε προηγούμενως 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 πειραμάτων ζώων 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 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

⁽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 B.40 (10) και B.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.

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 ατιμούς που ενδέχεται να συμπυκνώνονται σε αερολύματα. Ειδικό στόχο 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 απαιτήσεων. 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 επιλεγείσα 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 ατιμούς 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) 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.

Παρασκευάσμα 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.

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, μέθοδο 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 προσμιξέων. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί, μεταξύ άλλων, από τα ακόλουθα δεδομένα: χρόνος κατακράτησης και σχετική ζώνη κορυφής, μοριακό βάρος μέσω αναλύσεων φασματομετρίας μάζας ή αεροχρωματογραφίας 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).
23. Για πολύ περίπλοκα μείγματα που αποτελούνται από ατμούς/αέρια και αερολύματα (π.χ. ατμόσφαιρες καύσης και ελεγχόμενα χημικά εκπεμπόμενα από στοχοστρεφή προϊόντα/συσσκευές 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 αερολύμα). 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/φουσαλιδοδείκτης, 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 οδηγήσουν 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 αερολυμάτων 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, τιμών 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 εμφάνισης, 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.

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 δυνητικών 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 απαραίτητων 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 εμφάνισης και εξαφάνισης 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 βάνουσα 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.

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 συστηματικών επιδράσεων. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην παρατήρηση τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κόματος. 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 θανάτων 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 μακροσκοπικές 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 οξεία και υδροσκοπικές 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.

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, στρωμήν, 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,
- 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/m³ κ.λπ.)· μπορούν επίσης να αναφέρονται παρενθετικά μονάδες όγκου (π.χ. ppbm, ppbv),
- 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,
- ευρήματα νεκροψίας και ιστοπαθολογικά ευρήματα για καθένα από τα ζώα, εφόσον διατίθενται,
- κατηγορία ταξινόμησης βάσει του κανονισμού CLP και κρίσιμη τιμή LC₅₀.

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 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 βίαια καταληκτικά σημεία (7).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- (1) Κεφάλαιο Β.2 του παρόντος παραρτήματος: Οξεία τοξικότητα (αναπνευστική).
- (2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., και Schledde 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 Schledde 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/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 1: 129-134.
 - (5) Κεφάλαιο Β.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).
 - (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].
-

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

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

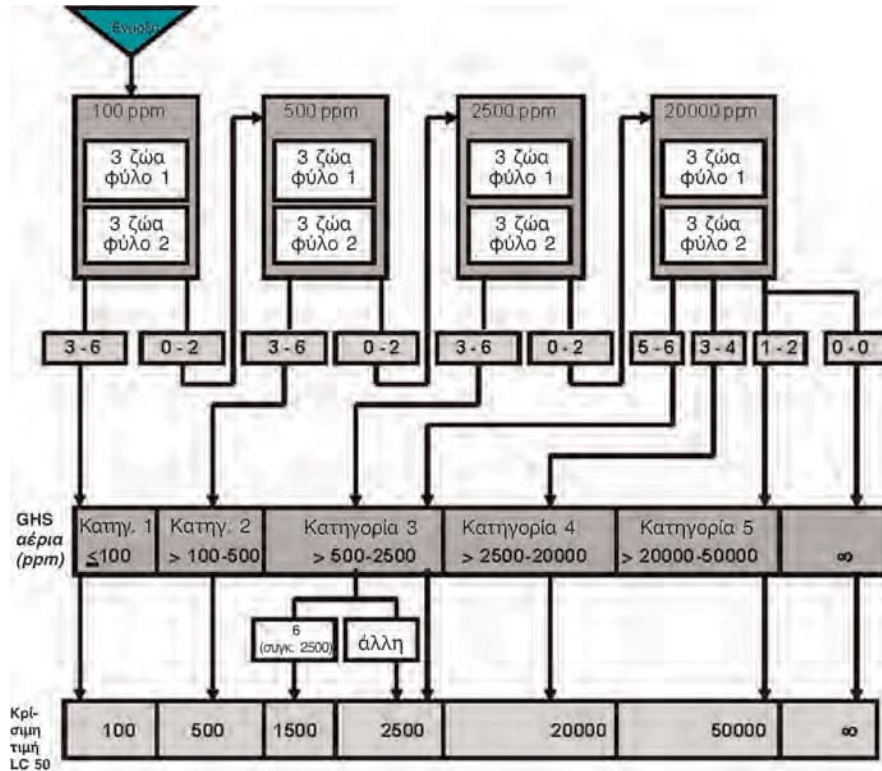
Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη.

⁽¹⁾ Στους ακόλουθους πίνακες γίνεται αναφορά στο Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Ουσιών (GHS). Το ισχύον 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.

Προσάρτημα 2α

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 100 ppm/4 ώρες στην περίπτωση αερίων

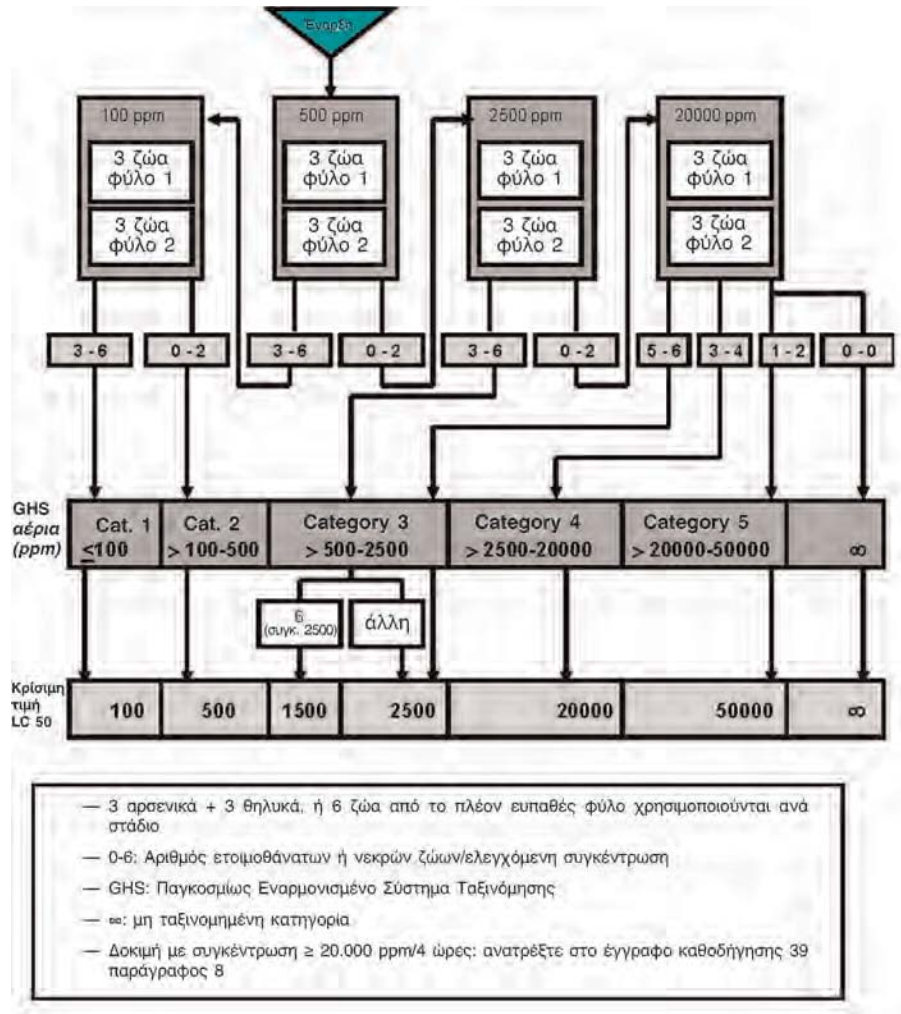


- 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
- 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
- GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
- ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
- Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

Προσάρτημα 2β

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

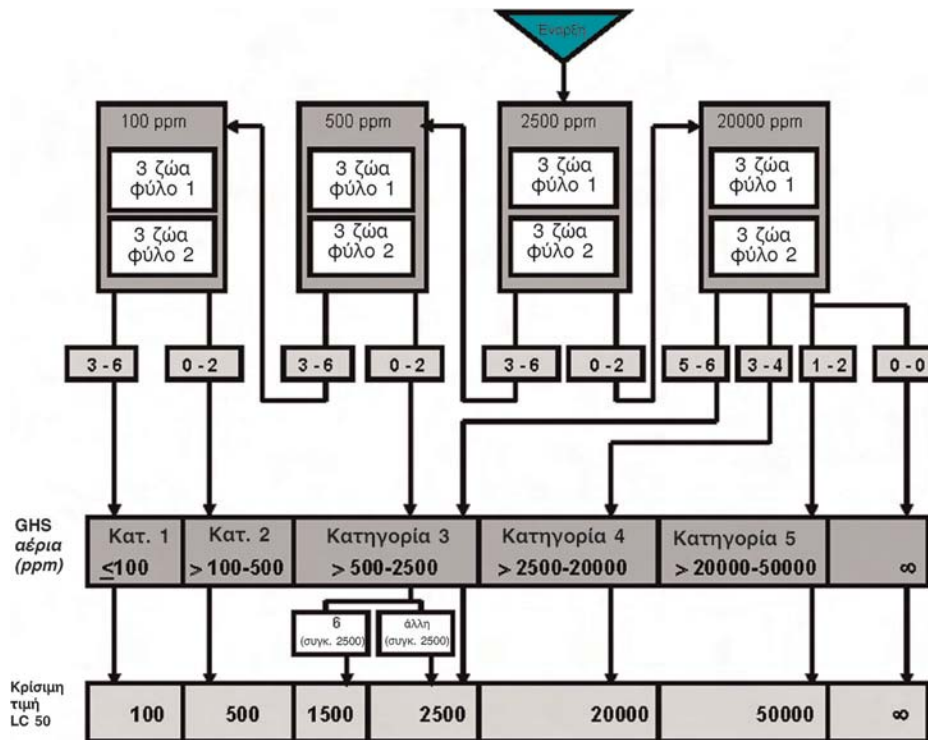
Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 500 ppm/4 ώρες στην περίπτωση αερίων



Προσάρτημα 2γ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 2 500 ppm/4 ώρες στην περίπτωση αερίων

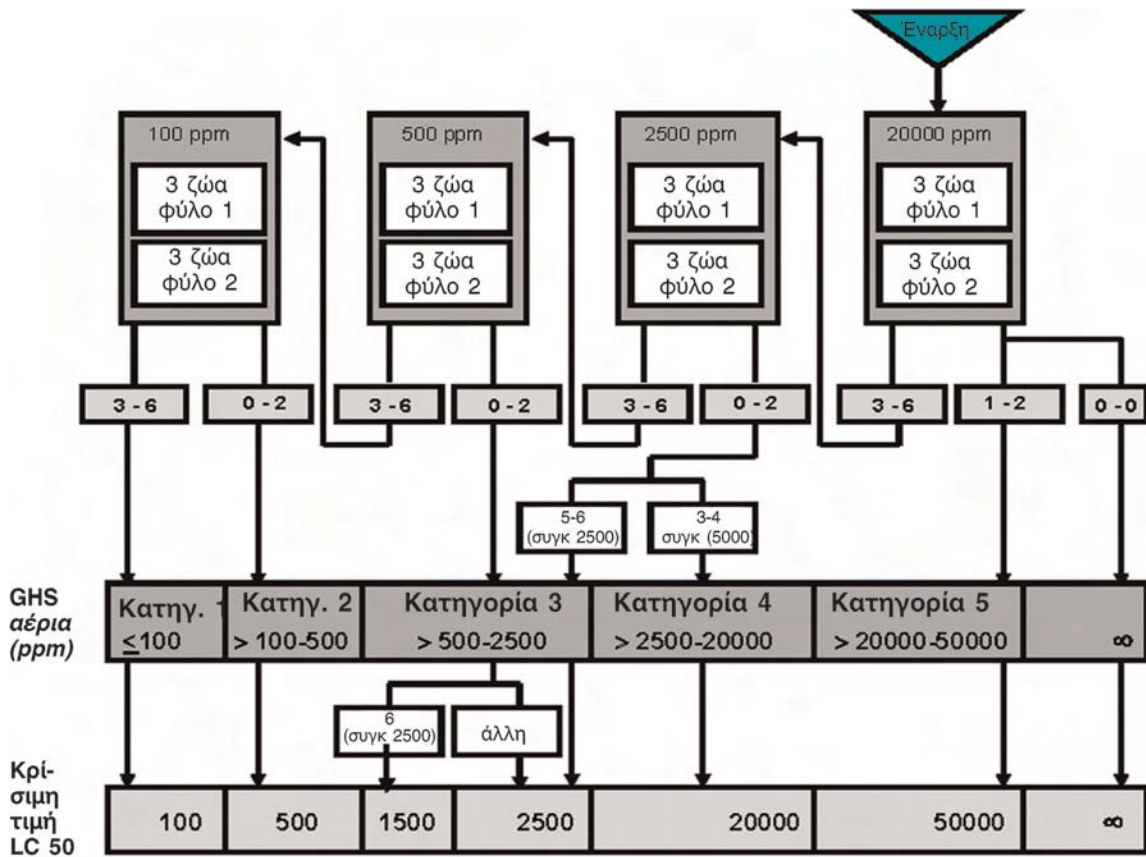


- 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
- 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
- GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
- ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
- Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

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 ετοιμοθάντων 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

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

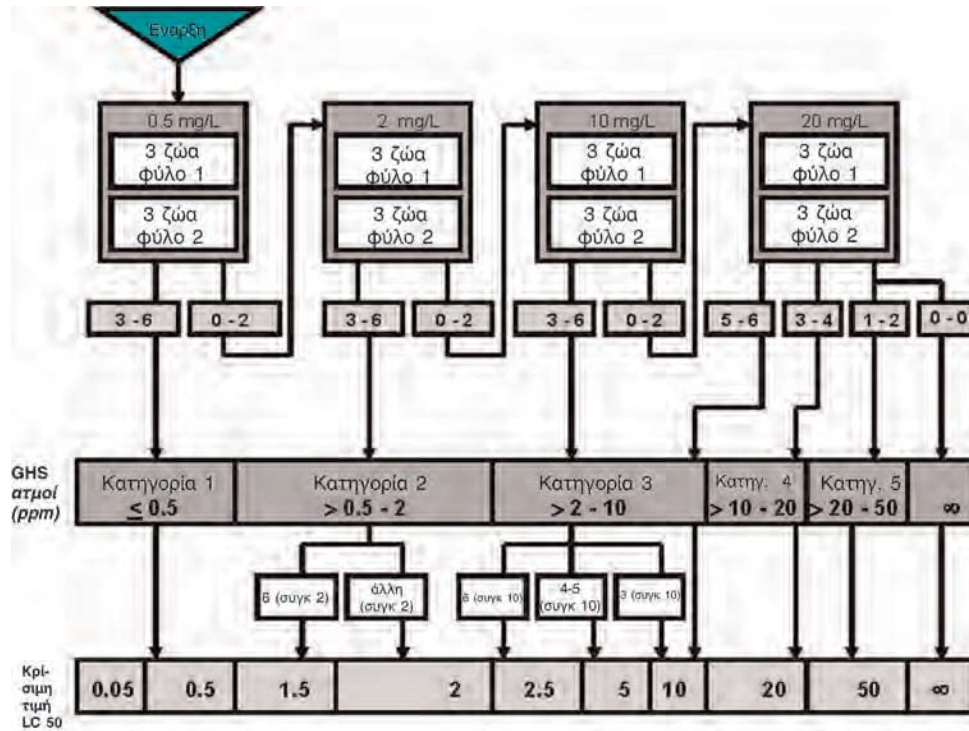
Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη.

⁽¹⁾ Στους ακόλουθους πίνακες γίνεται αναφορά στο Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Ουσιών (GHS). Το ισχύον 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.

Προσάρτημα 3α

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,5 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών

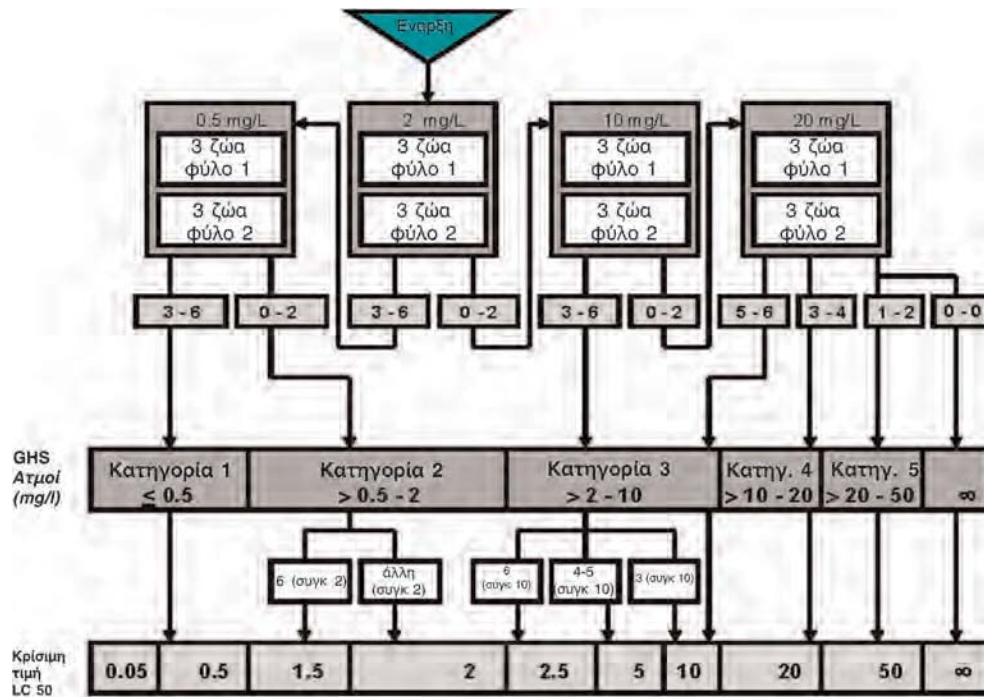


- 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
- 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
- GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
- ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
- Δοκιμή με συγκέντρωση 50 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

Προσάρτημα 3β

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 2 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατιμών

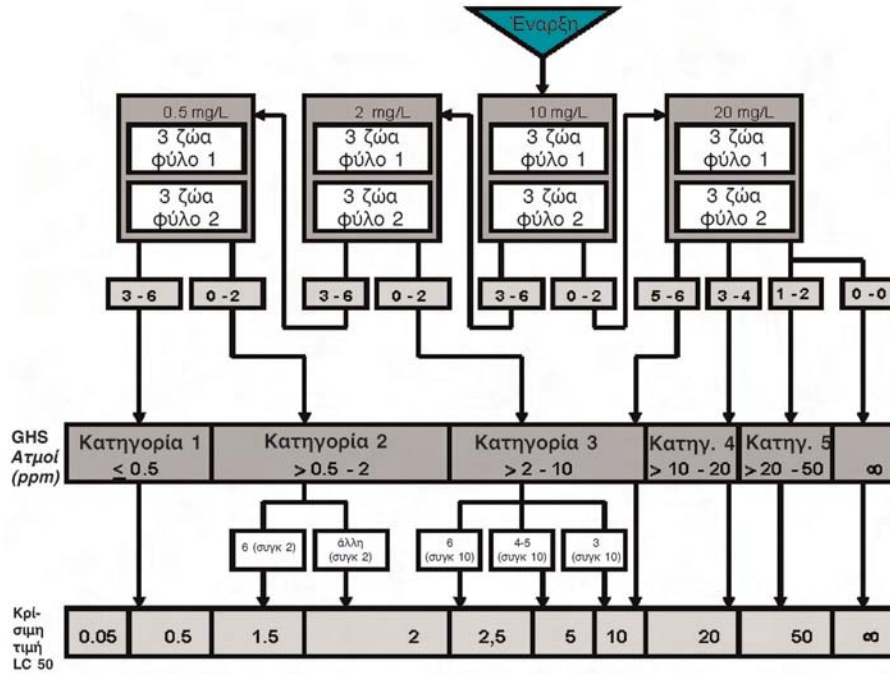


- 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
- 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
- GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
- ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
- Δοκιμή με συγκέντρωση 50 mg/L/4 ώρες; ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

Προσάρτημα 3γ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 10 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών

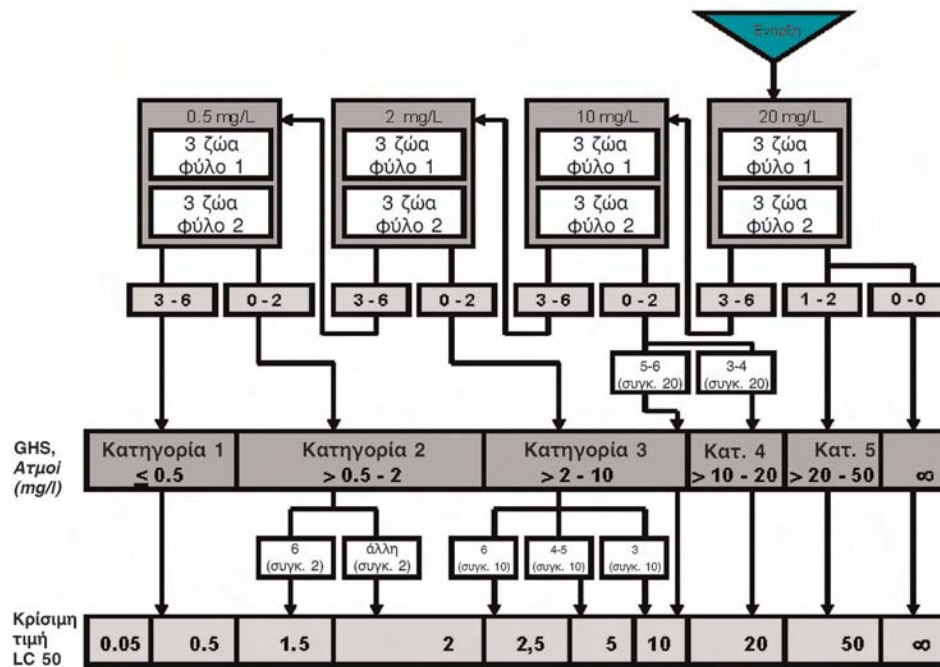


- 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
- 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
- GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
- ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
- Δοκιμή με συγκέντρωση 50 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

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

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

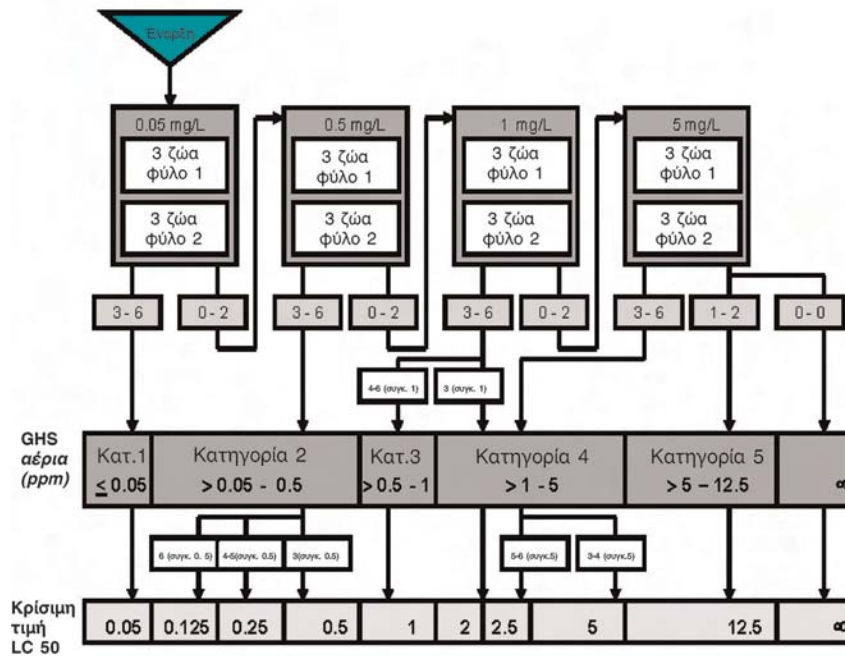
Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη.

⁽¹⁾ Στους ακόλουθους πίνακες γίνεται αναφορά στο Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης Χημικών Ουσιών (GHS). Το ισχύον 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.

Προσάρτημα 4α

Οξεία Αναπνευστική Τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,05 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση ατμών

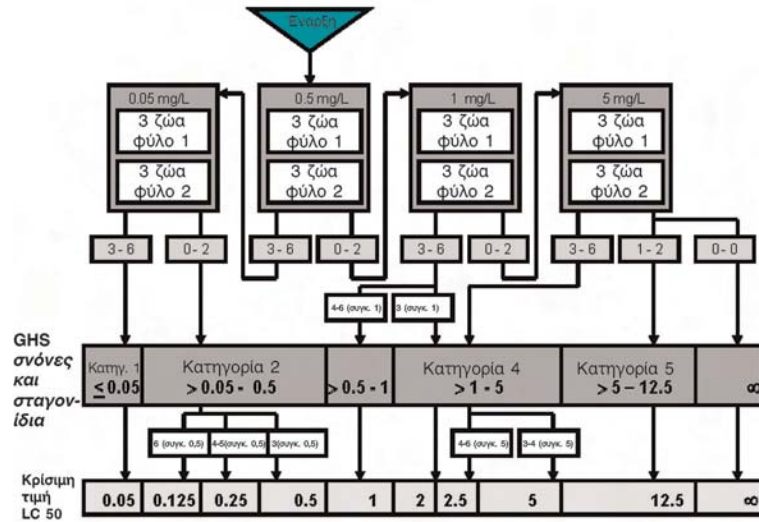


- 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
- 0-6: Αριθμός ετοιμοθάνατων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
- GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
- ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
- Δοκιμή με συγκέντρωση ≥ 20.000 ppm/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

Προσάρτημα 4β

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,05 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση αερολυμάτων

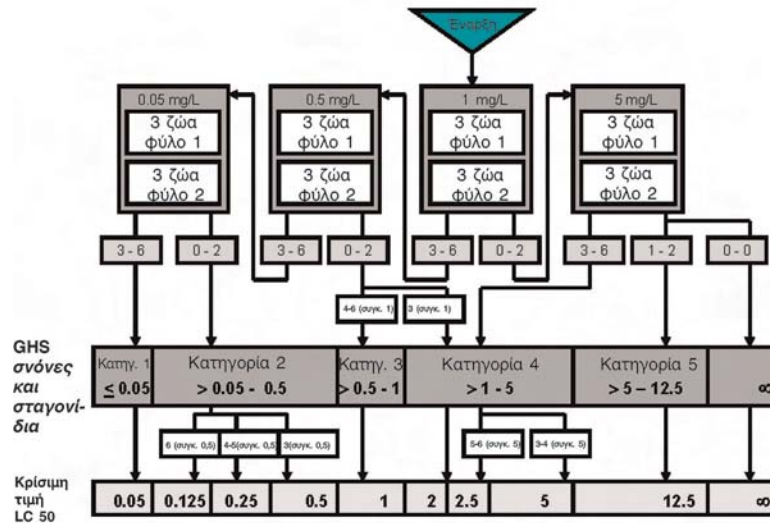


- 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
- 0-6: Αριθμός ετοιμοθάντων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
- GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
- ∞ : μη ταξινομημένη κατηγορία
- Δοκιμή με συγκέντρωση 12,5 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

Προσάρτημα 4γ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,05 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση αερολυμάτων

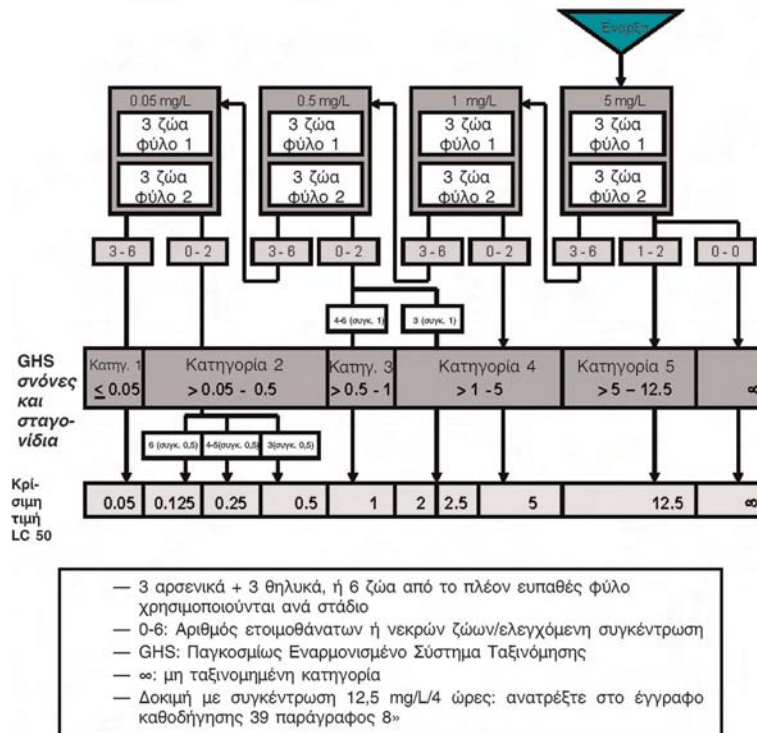


- 3 αρσενικά + 3 θηλυκά, ή 6 ζώα από το πλέον ευπαθές φύλο χρησιμοποιούνται ανά στάδιο
- 0-6: Αριθμός ετοιμοθάντων ή νεκρών ζώων/ελεγχόμενη συγκέντρωση
- GHS: Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης
- ∞: μη ταξινομημένη κατηγορία
- Δοκιμή με συγκέντρωση 12,5 mg/L/4 ώρες: ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης 39 παράγραφος 8

Προσάρτημα 4δ

Οξεία αναπνευστική τοξικότητα

Διαδικασία δοκιμής με αρχική συγκέντρωση 0,5 mg/L/4 ώρες στην περίπτωση αερολυμάτων



9. Το κεφάλαιο Γ.10 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«Γ.10. ΔΟΚΙΜΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΛΥΜΑΤΩΝ: Γ.10-A: ΜΟΝΑΔΕΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ — Γ.10-B: ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ

Γ.10-A: 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-A έως Γ4-Z 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 της συσκευής, τον τρόπο λειτουργίας, τα λύματα και την απόρριψη 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 προσάρτηματα 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 "πλήματος" σε σωλήνες μήκους 1 μέτρου (εσωτερικής διαμέτρου 14 mm), οι οποίες είχαν προηγουμένως εμβαπτιστεί σε συμυκνωμένη 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 CO₂ στο εκλυόμενο αέριο.
7. Τα βιοφίλτρα 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 συλλεγίσεις 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 εύκολο 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.
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 (επιβειωτικής) 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 (επιβειωτική) 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).

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 υδροχλωρικό 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 να υπερχειλίσουν στα αρχικά στάδια. Σε μια τέτοια περίπτωση, αντικαθίσταται η πορώδης επένδυση με καθαρή, με σιφονισμό της ιλύος από το δοχείο σε έναν καθαρό κάδο και αφαίρεση της αποφραγμένης επένδυσης. Αφού σφωγγιστεί 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 εμφύσηση, 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 προσοφούν 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/s².

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 δισόξιο 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 αραιώσης με νερό.

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 ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 4 mg· επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($Mg_7SO_4 \cdot 7H_2O$), 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 την ίδια περίπτωση 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, καθιζήμενα 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 αραιώσης 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 πηκτικές 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.
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 $pH 7 \pm 0,5$, 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 αθύουσα ελεγχόμενης θερμοκρασίας (κανονικό εύρος 20-25 °C) ή χρησιμοποιούνται μονάδες δοκιμής με υδροχλωρίδιο. Παρασκευάζεται επαρκής όγκος του απαιτούμενου οργανικού μέσου (παράγραφος 27-29). Αρχικά, το δοχείο αερισμού και ο διαχωριστήρας πληρούνται με το οργανικό μέσο και προστίθεται το εμβόλιο (παράγραφος 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 καθίζανουσας ιλύος. Μεταφέρεται οργανικό μέσο από τα αποθηκευτικά δοχεία στα δοχεία αερισμού (παράγραφος 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.

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 των 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 επανααιωρείται. Ελέγχονται και καθαρίζονται τακτικά όλοι οι σωληνες και τις σωληνώσεις για την πρόληψη της ανάπτυξης βιομεμβράνης. Ανακυκλώνεται η καθιζόμενη ιλύς από τον διαχωριστήρα στο δοχείο αερισμού, κατά προτίμηση με διαλείπουσα άντληση. Στο σύστημα πορώδους δοχείου δεν γίνεται ανακύκλωση, αλλά πρέπει να εξασφαλιστεί 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 ,
- 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 καθιζήμενη ιλύ (τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της αεροκίνητης αντλίας περιορίζουν την ελάχιστη ταχύτητα ροής της ιλύος που επιστρέφει στο 12πλάσιο 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 ($> 2 \text{ mg/l}$) και ότι η θερμοκρασία διατηρείται στις απαιτούμενες τιμές (κατά κανόνα μεταξύ 20°C και 25°C). Διατηρείται το pH στην τιμή $7,5 \pm 0,5$ 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 $0,45 \mu\text{m}$ ή φυγοκεντρώνται σε περίπου $40\,000 \text{ m/s}^2$ για περίπου 15 λεπτά. Η φυγοκέντρωση 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 προοροφώμενες χημικές ουσίες, συνιστάται η μέτρηση της ποσότητας της προοροφωμένης 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.
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:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_0)}{C_s} \times 100$$

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_0 = 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 δραστηριότητας της ενεργού ιλύος κατά τη δοκιμή. Υπολογίζεται η ποσοστιαία απομάκρυνση από την εξίσωση:

$$D_B = \frac{C_M - E_0}{C_M} \times 100$$

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)

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 αραιώση 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 ειδοείται 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 οριζόντιωσης της καμπύλης.

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 (λαμβανόμενης υπόψη της προσρόφησης, εάν υπάρχει). Η λανθάνουσα φάση παρουσιάζει συχνά μεγάλη μεταβλητότητα και μικρή αναπαραγωγιμότητα.

Φάση σταθερής οριζόντιωσης

59. Η φάση οριζόντιωσης της καμπύλης απομάκρυνσης σε μια συνεχή δοκιμή ορίζεται ως η φάση κατά την οποία σημειώνεται η μέγιστη αποικοδόμηση. Η φάση οριζόντιωσης 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 οριζόντιωσης. 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 οριζόντιωσης (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 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.
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 $D_{t,c}$), D_B , D_{St} σε μορφή πίνακα και οι καμπύλες απομάκρυνσης,
- πληροφορίες σχετικά με τη λανθάνουσα φάση και τη φάση οριζόντιωσης, 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,
- σύζηση των αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

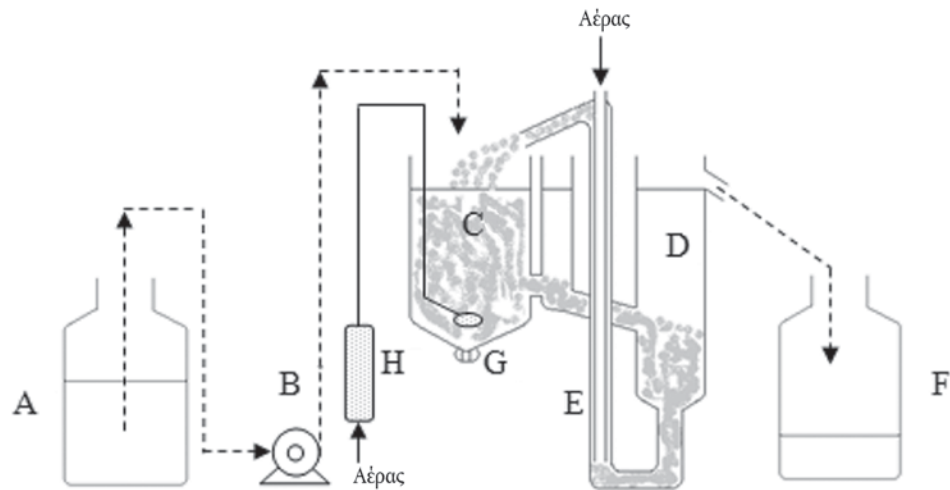
- (1) Swisher R.D. (1987), "Surfactant Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.
 - (2) German Government (1962), Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents, *Bundesgesetzblatt*, Pt.1 No.49: 698-706.
 - (3) Painter H.A. και King E.F. (1978a), WRC 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 λείψης 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 Jornada Com. Espanol. Deterg.*: 33-48.
 - (14) Birch R.R. (1984), Biodegradation of nonionic 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.
-

Προσάρτημα 1

Σχήμα 1

Εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της βιοαποικοδομησιμότητας

Μονάδα Husmann

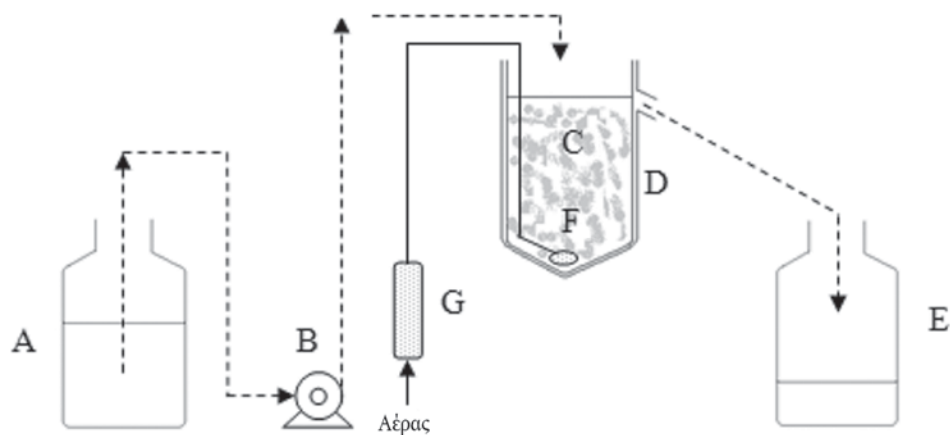


- | | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| A. Δοχείο αποθήκευσης | E. Αεροκίνητη αντλία |
| B. Δοσομετρική αντλία | F. Δοχείο συλλογής |
| C. Θάλαμος αερισμού (χωρητικότητα 3L) | G. Αεριστήρας |
| D. Δοχείο καθίζησης | H. Μετρητής ροής αέρα |

Σχήμα 2

Εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της βιοαποικοδομησιμότητας

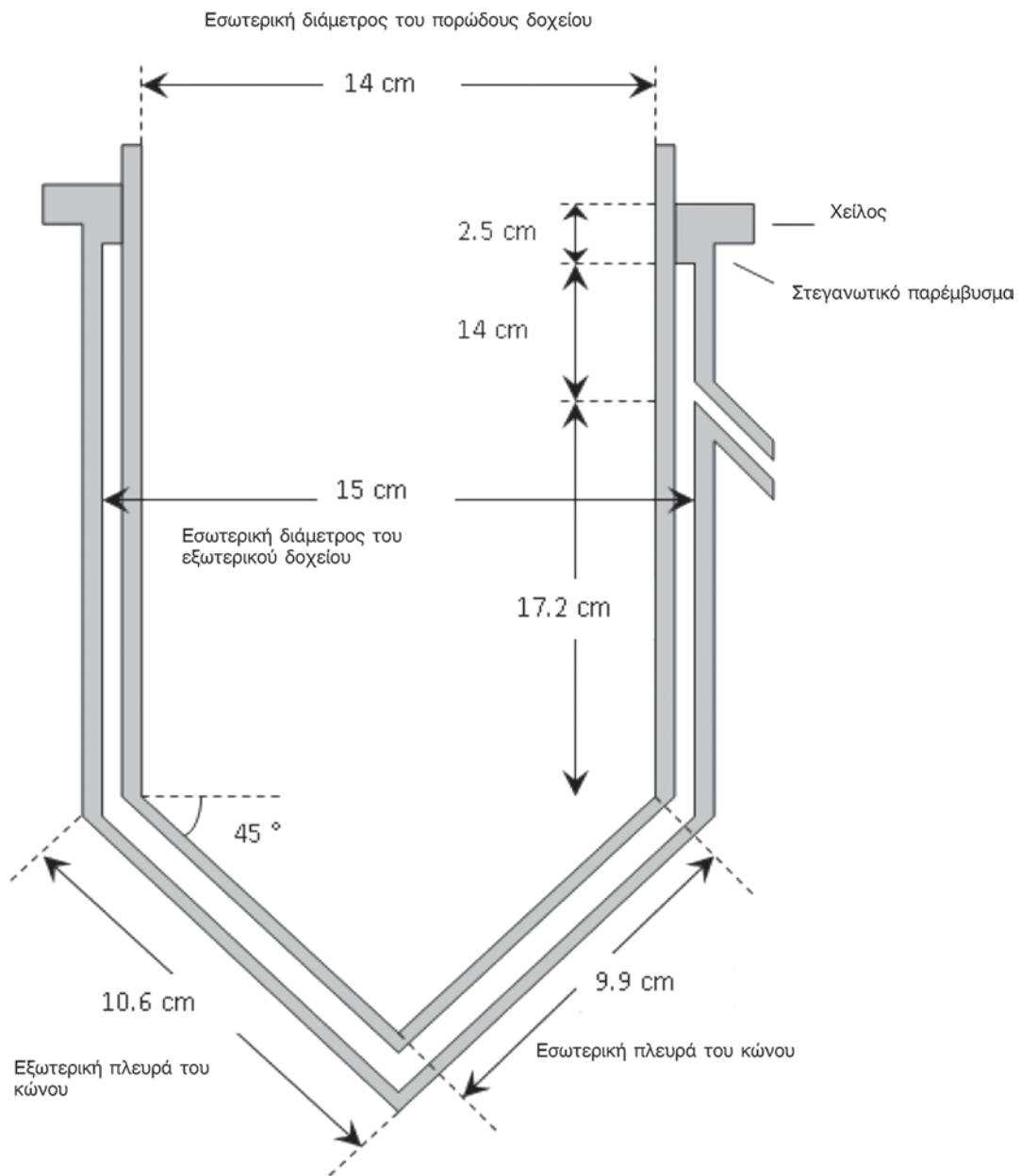
Πορώδες δοχείο



- | | |
|---------------------------------|-----------------------|
| A. Δοχείο αποθήκευσης | E. Δοχείο συλλογής |
| B. Δοσομετρική αντλία | F. Διαχυτήρας |
| C. Πορώδες δοχείο αερισμού | G. Μετρητής ροής αέρα |
| D. Εξωτερικό αδιαπέραστο δοχείο | |

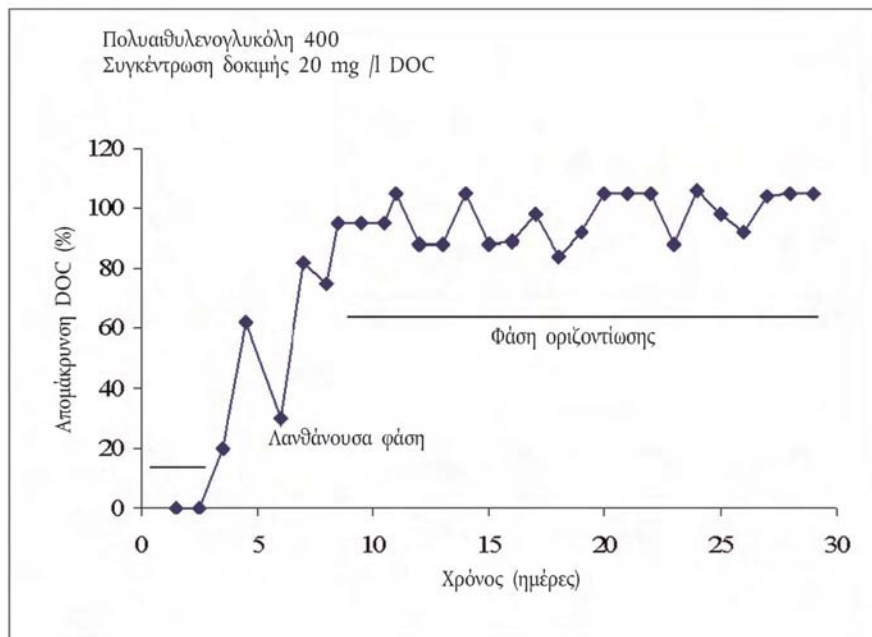
Σχήμα 3

Στοιχεία πορώδους δοχείου αερισμού χωρητικότητας 3 λίτρων



Προσάρτημα 2

Παράδειγμα καμπύλης απομάκρυνσης



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 = προσδιοριζόμενη % 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 όγκος 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.

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 αναπτύσσονται 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.

Ο βαθμός αναστολής που προκαλείται από την παρουσία της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = 100 (R_c - R_i)/R_c$$

όπου:

R_c = ποσοστό απομάκρυνσης στα δοχεία-μάρτυρες

R_i = 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.

Προσάρτημα 5

Δυσδιάλυτες στο νερό ελεγχόμενες χημικές ουσίες — πτητικές χημικές ουσίες

Δυσδιάλυτες στο νερό χημικές ουσίες

Λίγες είναι οι εκδόσεις 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 υπερχημητικής 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 εκδόσεις 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 κρουπαγίδας ή παγίδας εκδιώξεως-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.

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

$S_{IP} = S_I = 150 \text{ mg/l}$

$S_{VP} = 150 \text{ mg/l}$ ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22,5 \text{ mg/l}$

$S_E = 50 \text{ μg/l}$

Άρα,

$R_{VP} = 100 \%$, $R_V = 15 \%$

$R_T = 100 \%$ και $R_{BA} = 85 \%$.

Θεωρείται ότι το βενζόλιο δεν προσροφήθηκε στην ιλύ.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- (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.

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 ουσίας 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. Διερευνούνται 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-A 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_d), 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.
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, 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-A.

ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ

8. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 14 και 15 του κεφαλαίου Γ.10-A.

ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Εφαρμόζεται η παράγραφος 16 του κεφαλαίου Γ.10-A.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

10. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 17 και 18 του κεφαλαίου Γ.10-A.

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-A). Η επένδυση τοποθετείται σε ένα εξωτερικό αδιαπέραστο δοχείο από πολυαιθυλένιο, το οποίο αποτελείται από δύο μέρη: μια κυκλική βάση, με σπές 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 ανάμιξη 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 αιώσους σταθερής θερμοκρασίας. Απαιτούνται αντλίες για την τροφοδοσία των δοχείων αερισμού με το διάλυμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και τα καθιζήμενα 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-A

Αναλυτικός εξοπλισμός

14. Εφαρμόζεται η παράγραφος 24 του κεφαλαίου Γ.10-A.

Νερό

15. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 25 και 26 του κεφαλαίου Γ.10-A.

Οργανικό μέσο

16. Εφαρμόζεται η παράγραφος 27 του κεφαλαίου Γ.10-A.

Συνθετικά λύματα

17. Εφαρμόζεται η παράγραφος 28 του κεφαλαίου Γ.10-A.

Οικιακά λύματα

18. Εφαρμόζεται η παράγραφος 29 του κεφαλαίου Γ.10-A.

Ενεργός ιλύς

19. Εφαρμόζεται η παράγραφος 30 του κεφαλαίου Γ.10-A.

Διαλύματα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας

20. Εφαρμόζονται οι παράγραφοι 31 και 32 του κεφαλαίου Γ.10-A.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρασκευή του εμβολίου

21. Εφαρμόζεται μόνο η παράγραφος 34 του κεφαλαίου Γ.10-A — 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 πρωτοβάθμιας 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 περιόσεως ιλύος. Παρακολουθούνται επίσης συχνά και, εφόσον είναι αναγκαίο, ρυθμίζονται σε $\pm 10\%$, οι παροχές εισροής, εκροής και περιόσεως 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.

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 μ_m 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 είναι 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_0/X_0) 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_0 θα πρέπει να είναι ίση ή να υπερβαίνει τη σχετική τιμή K_S , της σταθεράς ημικορεσμού.

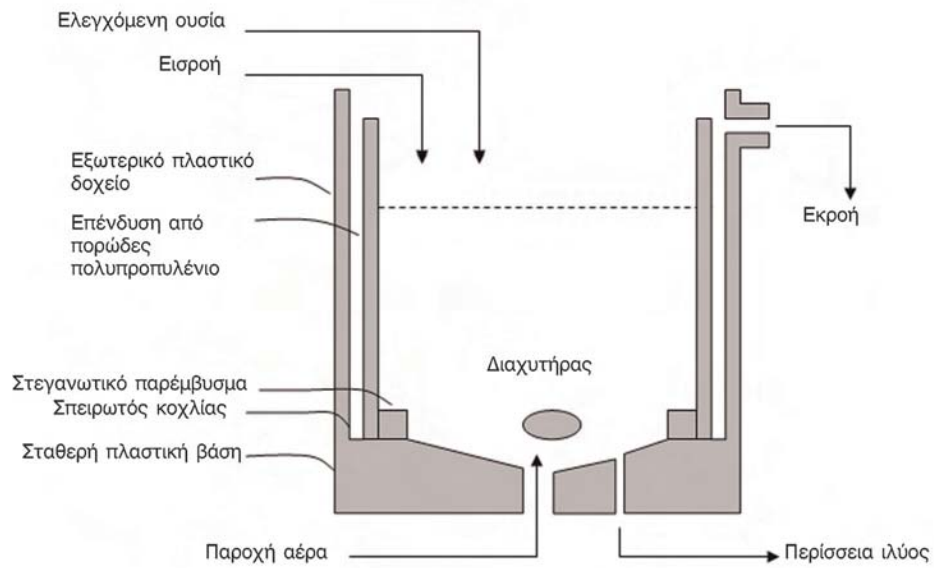
30. Η μεταβλητότητα και άλλες πτυχές της κινητικής της βιοαποικοδόμησης συζητήθηκαν σε πρόσφατη ημερίδα της SETAC (5). Από τις σχετικές μελέτες, δημοσιευμένες και υπό δημοσίευση, αναμένεται σύντομα να διαμορφωθεί σαφέστερη εικόνα της κινητικής στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, ώστε να καταστεί 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.
 - (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.
-

Προσάρτημα 6.1

Πορώδες δοχείο με έλεγχο του χρόνου παραμονής της ιλύος (SRT)



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:

$$\text{ή} \quad \frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

$$\text{όπου} \quad S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

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 (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:

$$\text{όπου} \quad \frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

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

$$\text{και} \quad \theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

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:

- 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.
- 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 $S_1 \cdot \vartheta_s$.

Η αναδιάταξη της εξίσωσης (1) δίνει

$$\frac{S_1 \cdot \vartheta_s}{1 + \vartheta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

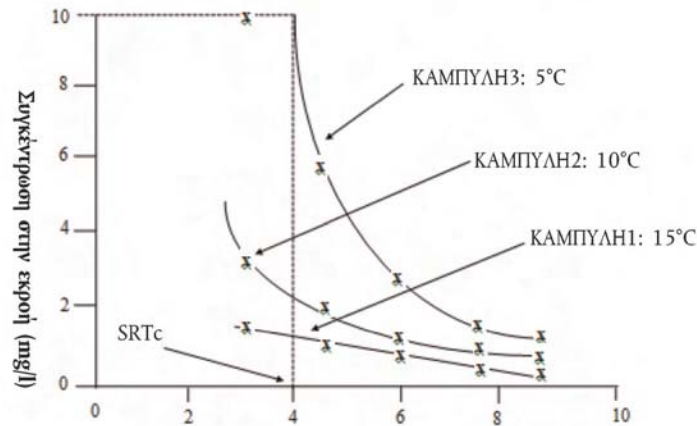
Εάν το K_d είναι μικρό, τότε $1 + \vartheta_s \cdot K_d \sim 1$ και η εξίσωση [5] γίνεται:

$$S_1 \cdot \vartheta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

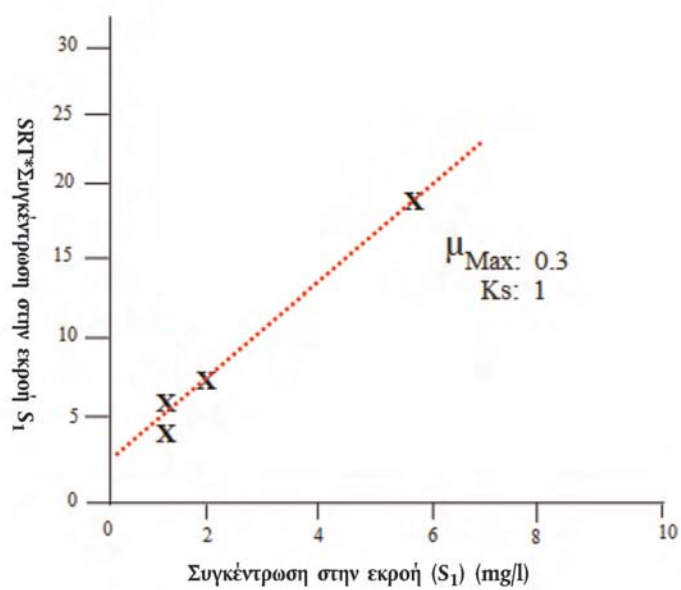
Επομένως, η γραφική παράσταση πρέπει να είναι ευθεία γραμμή (βλέπε σχήμα 2) με κλίση $1/\mu_m$ και με σημείο τομής K_s/μ_m , επίσης $\vartheta_s \sim 1/\mu_m$.

Σχήμα 1

Τρεις θερμοκρασίες, πέντε χρόνοι SRT



Σχήμα 2

Γραμμή παλινδρόμησης SRT· S_1 συναρτήσει του S_1 σε $T = 5\text{ }^\circ\text{C}$ 

Γλωσσάριο:

Συγκέντρωση στην εκροή

Καμπύλη

Προσάρτημα 7

ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΧΑΜΗΛΟ ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ (μg/l)

- 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.
- 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, πηκτικότητα 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 σηματομενές με ¹⁴C. 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 σηματομενών με ¹⁴C χημικών ουσιών.

Δοκιμή SCAS

- Αργότερα προτάθηκε μια απλούστερη δοκιμή δύο σταδίων (4)(5)(6): η μέθοδος ημισυνεχούς ενεργού ιλύος (Semi-Continuous Activated Sludge — SCAS) ακολουθείται από βραχυχρόνια 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 καθίζησιμότητας της ιλύος) με την προσθήκη φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, εκχυλισματος ζυμομυκήτων, χλωριούχου σιδήρου (III) και αλάτων ιχθυοστοιχείων και το COD τους αυξήθηκε σε περίπου 750 mg/l, με αύξηση της συγκέντρωσης πεπτόνης και εκχυλισματος κρέατος. Οι μονάδες λειτουργούσαν σε 24ωρο: αερισμός για 23 ώρες, απόρριψη περίσσειας ιλύος, καθίζηση, αφαίρεση του υπερκείμενου 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.
- Μετρώντας οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας αρχικά και στο τέλος του αερισμού και η δοκιμή συνεχίζεται μέχρις ότου επιτευχθεί σταθερή απομάκρυνση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Αυτό μπορεί να διαρκέσει από μία εβδομάδα έως αρκετούς μήνες.

Βραχυχρόνια δοκιμή

- 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 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 φυγοκεντρώνται πριν από την κατάλληλη ανάλυση.

Υπολογισμοί

- 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:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g \text{ h})$$

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)

- 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.
- (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.

Γ.10-B: 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-A). 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 Tuesdale 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 CO₂ στο αέριο εξόδο.
4. Μια αρκετά διαφορετική προσέγγιση υιοθέτησαν οι Gloyna et al. (4), οι οποίοι εφήυραν 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 CO₂ στο αέριο εξόδο.

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 βιοφίλτρα. Οι συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται επαρκής απομάκρυνση της οργανικής ύλης και, εάν απαιτείται, οξείδωση του αμμωνίου.
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 υποτιθέεται 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 βιοαποικοδόμησης (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).

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 οι 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 ατσάλδουρμα και στο άνω άκρο (τροφοδοσίας) υπάρχει ένα εσωτερικό χείλος βάρους 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 επίσφραγα περιστρέφονται από κινητήρα μικρής, μεταβλητής ταχύτητας. Η θερμοκρασία των σωλήνων ελέγχεται μέσω της εγκατάστασής τους σε αιώουσα 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 CO₂ 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 (Α) (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 (Β), 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 0,45 μm), 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/s².
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.

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· άνδρο όξινο φωσφορικό κάλιο (K₂HPO₄), 28 mg· χλωριούχο νάτριο (NaCl), 7 mg· διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂·2H₂O), 4 mg· επταένυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO₄·7H₂O), 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 καθιζήμενα λύματα που συλλέγονται καθημερινά από εγκαταστάσεις επεξεργασίας οι οποίες δέχονται κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα. Θα πρέπει να συλλέγονται από την τάφρο υπερχειλίσσης 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 αραιώσης 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 αποιονισμένο 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 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 $\text{pH } 7 \pm 0,5$, 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 αραιώση 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 αραιώση, 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 καθιζήμενα 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 $125 \pm 12,5$ 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 αλλάξει, 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.

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 καθιζήμενων 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 φυγοκεντρώνται σε περίπου 40 000 ml/sec² 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 και 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.

Απόσπαση της μεμβράνης

42. Η αιφνίδια απόσπαση μεγάλων ποσοτήτων περισίσειας μεμβράνης από τους σωλήνες (sloughing) εμφανίζεται σε σχετικά τακτά χρονικά διαστήματα. Για να εξασφαλιστεί 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:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_0)]/C_s \%$$

όπου

D_t = ποσοστό απομάκρυνσης DOC (ή COD) σε χρόνο t ,

C_s = 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),

E_0 = 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 δραστηριότητας της βιομεμβράνης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Υπολογίζεται η ποσοστιαία απομάκρυνση από την εξίσωση:

$$D_B = 100 (1 - E_0/C_m) \%$$

όπου

C_m = 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:

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e/S_i) \%$$

όπου

S_i = μετρούμενη ή, κατά προτίμηση, 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)

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:

$$D_{SC} = 100 (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c) \%$$

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-A). 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 ειθίσται να παραμένει υψηλός ο βαθμός απομάκρυνσης DOC των προσροφησιμων 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 υπάρχει). Η λανθάνουσα φάση παρουσιάζει συχνά μεγάλη μεταβλητότητα και μικρή αναπαραγωγικότητα.

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_i) (και $D_{στ}$, εάν είναι διαθέσιμη) της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη φάση οριζόντιωσης. 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.

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 οριζόντιωσης (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 υπερκεείμενης 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.

Έγκυρτητα 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,
- 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_{t_c}), 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.

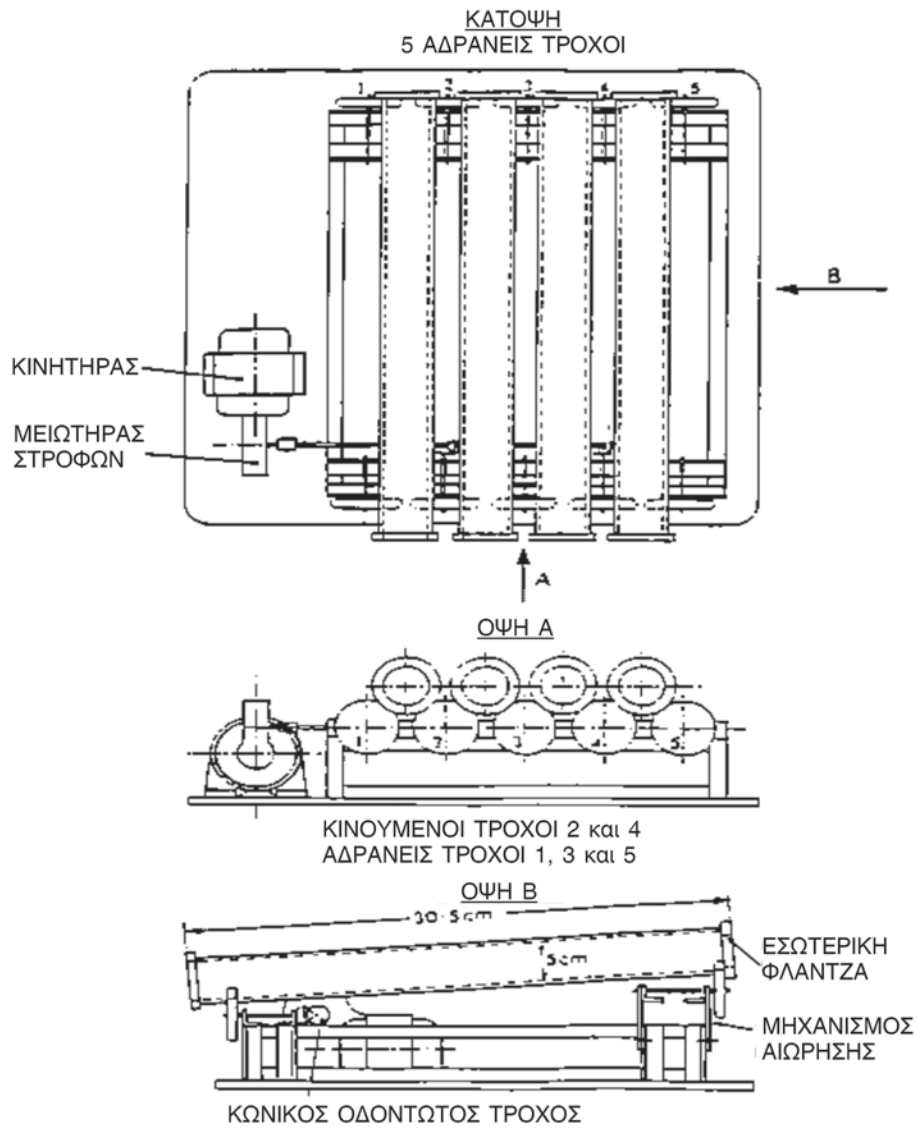
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- (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.

Προσάρτημα 8

Σχήμα 1

Περιστρεφόμενοι σωλήνες



Γλωσσάριο:

Κάτοψη

Όψη Α/Β

Κινούμενοι τροχοί

Αδρανείς τροχοί

Κινητήρας

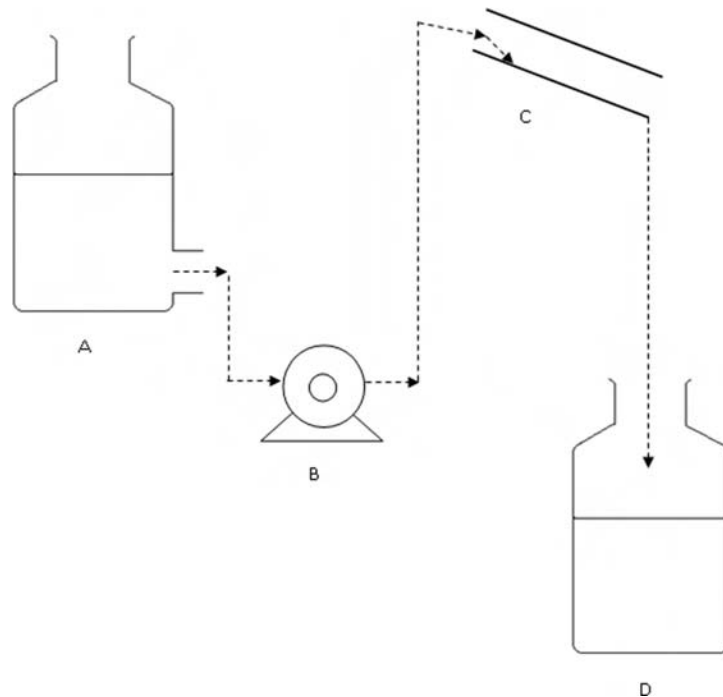
Μειωτήρας στροφών

Εσωτερική φλάντζα

Μηχανισμός αιώρησης

Κωνικός οδοντωτός τροχός

Σχήμα 2
Διάγραμμα ροής



- A: Δεξαμενή τροφοδοσίας
 B: Περισταλτική αντλία
 C: Περιστρεφόμενος σωλήνας
 D: Δοχείο συλλογής εκρών

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.”.

10. Προστίθενται τα κεφάλαια Γ.27, Γ.28, Γ.29 και Γ.30:

«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 ιζήμα. 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 δυνατικές 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 ενθλιγμένων 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 αμόλυπτου 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.

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 συκέντρωση που μπορεί να προκαλέσει × % μείωση της εμφάνισης προνυμφών ή της επιβίωσης ή ανάπτυξής τους (π.χ. EC₁₅, EC₅₀ κ.λπ.), είτε δοκιμίας στατιστικής υπόθεσης για τον προσδιορισμό NOEC (συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις)/LOEC (κατώτατη συκέντρωση παρατηρούμενων επιδράσεων). Στη δεύτερη περίπτωση, απαιτείται σύγκριση μεταξύ των τιμών επίδρασης και των τιμών-μάρτυρων 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 ενθλιγμένων *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 $\pm 1,0$ °C. Μπορεί να ελέγχεται με τη χρήση ισοθερμικής αίθουσας και, στην περίπτωση αυτή, η θερμοκρασία δωματίου πρέπει να επιβεβαιώνεται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα.

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 cm² 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 yoshimatsui*. 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) καολιντικής 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 αποιονισμένο νερό για να επιτευχθεί υγρασία του τελικού μείγματος της τάξης του 30-50 %
 - ε) προστίθεται ανθρακικό ασβέστιο χημικώς καθαρό (CaCO₃) για τη ρύθμιση του pH του τελικού μείγματος του ιζήματος στην τιμή $7,0 \pm 0,5$. Η περιεκτικότητα του τελικού μείγματος σε οργανικό άνθρακα θα πρέπει να είναι 2 % ($\pm 0,5$ %) και να ρυθμίζεται με τη χρήση κατάλληλων ποσοτήτων τύρφης και άμμου, σύμφωνα με τα στοιχεία α) και γ).
14. Η πηγή της τύρφης, καολιντικής 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.

Νερό

15. Κάθε νερό που είναι σύμφωνο με τα χημικά χαρακτηριστικά του αποδεκτού νερού αραιώσης, που απαριθμούνται στα προσάρτηματα 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 CaCO₃. 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 ιζήμα. Διάλυμα παρακαταθήκης της ελεγχόμενης ουσίας που έχει διαλυθεί σε αποιονισμένο νερό αναμειγνύεται με το μορφοποιημένο ιζήμα με τη βοήθεια πρέσας, αναμεικτή 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 ιζήμα θα πρέπει επομένως να παρασκευάζεται με λιγότερη άμμο). Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η ελεγχόμενη ουσία που προστίθεται στο ιζήμα είναι πλήρως και ομοιογενώς κατανεμημένη μέσα στο ιζήμα. 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. EC₁₅, EC₅₀) 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).
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 ιδιόντες 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-Whitney. 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 αποιονισμένο νερό για να αποτρέπεται η συσσώρευση αλάτων.

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 παλιό 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 διηθημένου από ένα εναίωρημα 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 yoshimatuī* 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 σιφόνιο, 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.

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. yoshimatsui*) 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 τριφυλλίου (*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 γυάλινο 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. yoshimatsui* 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.

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 τουλάχιστων 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 περαιοειδείς 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 χρυσαλλιδιών 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 επίζωσων 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 ιζήμα. 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.
40. Η φυγοκέντρωση, 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 αμωνία 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 αναπτυγθέντων 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 EC₅₀ 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 συνθήκες παραδοχής 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 (συνήθως αναφέρεται ως "εξωδιωνυμική" διασπορά), θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια ανθεκτική δοκιμασία Cochran-Armitage ή Fisher exact, όπως η προτεινόμενη στη βιβλιογραφική παραπομπή (21).

Προσδιορίζεται το άθροισμα των χειρονόμων που εμφανίζονται ανά δοχείο, ne, και διαίρεται 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 προκειμένου, 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 παρουσιών 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 \times υποτίθεται ότι εμφανίστηκε στο 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 υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m f_i x_i}{n_e}$$

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)

1_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 ιζήμα, 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:

- ιζήμα 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 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 (συνεωμένα 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. Strelke 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.
- (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. Statist. 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.
-

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 απομεινεί 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.

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 ενθλίκων. Ο κλωβός πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος για να επιτρέπει στα εμφανιζόμενα ενθλικά 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 αραιώσης

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", βλ.επε 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 αραιώσης 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 ενθλίκων

7. Ορισμένοι πειραματιστές έχουν προτείνει τον εμποτισμό ενός τεμαχίου βαμβακιού με κορεσμένο διάλυμα σακχαρόζης για να χρησιμεύσει ως τροφή των εμφανιζόμενων ενθλίκων εντόμων.

Εμφάνιση

8. Στους 20 ± 2 °C θα αρχίσουν να εξέρχονται ενθλικά έντομα από τα δοχεία εκτροφής προνυμφών μετά από περίπου 13-15 ημέρες. Τα αρσενικά διακρίνονται εύκολα από τις περαιοειδείς κεραίες τους.

Μάζες αυγών

9. Μόλις εμφανιστούν ενθλικά 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 ενθλίκων χειρονόμων. Με τη χρήση του συστήματος αυτού, θα παράγεται μια κανονική ποσότητα ενθλίκων με την ελάχιστη δυνατή διαχείριση.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής “M4” και “M7”

12. Ο Elenđt (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” (Elenđt, προσωπική επικοινωνία). Το διάλυμα δοκιμής δεν πρέπει να παρασκευάζεται σύμφωνα με τους Elenđt και Bias (1990), επειδή οι συγκεντρώσεις NaSiO_3 , $5 \text{H}_2\text{O}$, 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 εμφανίζονται 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.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streløke and H.Köpp, Berlin 1995.

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
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ⁽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
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	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
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ^{(1) (2)}	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ^{(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 · 2 H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

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, *Protoptasma* 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.

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 καολίνη ≥ 30 %	20
Οργανικός άνθρακας	Ρυθμίζεται με προσθήκη τύρφης και άμμου	2 ($\pm 0,5$)
Ανθρακικό ασβέστιο	CaCO_3 , κονιοποιημένο, χημικά καθαρό	0,05 - 0,1
Νερό	Αγωγιμότητα $\leq 10 \mu\text{S/cm}$	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 $5,5 \pm 0,5$ 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 $6,0 \pm 0,5$. Στη συνέχεια, το εναιώρημα τύρφης αναμειγνύεται με τα άλλα συστατικά (άμμος και καολινιτική άργιλος) και με απιονισμένο νερό για να ληφθεί ένα ομοιογενές ιζήμα 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) ιζήμα 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.

Προσάρτημα 4

Χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραιώσης

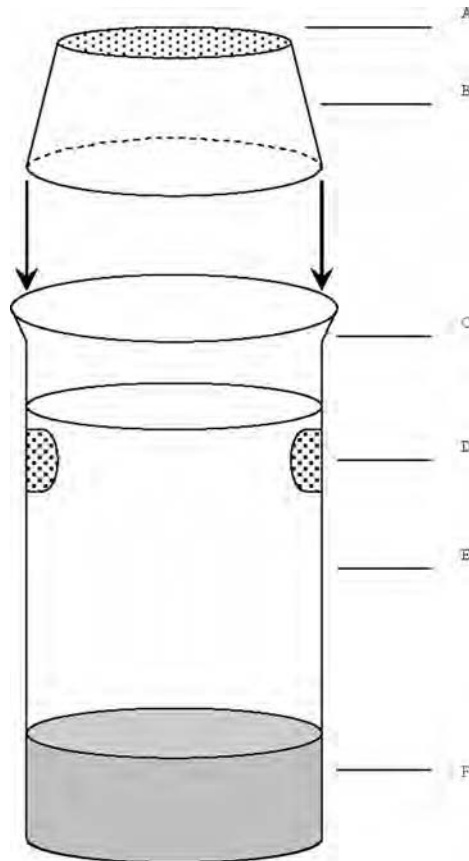
Ουσία	Συγκεντρώσεις
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 µg/l
Σκληρότητα ως CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 µg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
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).

Προσάρτημα 5

Κατευθύνσεις για την παρακολούθηση της εξέδου των προνυμφών χειρονομίδων

Τοποθετούνται παγίδες εξέδου 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 νάλιν

D: έξοδοι σίτας για την ανταλλαγή νερού

B: ανεστραμμένα πλαστικά ποτήρια

E: νερό

C: ποτήρι έκθεσης χωρίς χείλος

F: ίζημα

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 οποίες 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 ψευκαστικού 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 συσώρευσης, 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 ιζήμα 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 διερεύνηση των επιδράσεων ασταδίων χημικών ουσιών, μπορούν να αποσύρονται πρόσθετα δοχεία επανάληψης μετά από μια περίοδο δέκα ημερών.
4. Τα μετρούμενα καταληκτικά σημεία είναι ο συνολικός αριθμός εμφανιζόμενων ενθλιγμένων 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,
 - 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 \times % μείωση της εμφάνισης ενθλιγμένων 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 ιζήμα και η σταθερότητά της στο νερό και το ιζήμα. Θα πρέπει να διατίθεται μια αξιόπιστη μέθοδος ανάλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας στο υπερκείμενο νερό, στο ενδοπορικό νερό και στο ιζήμα, 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 ενήλικων *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,
- η θερμοκρασία του νερού δεν πρέπει να διαφέρει κατά περισσότερο από $\pm 1,0$ °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 cm² 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 yoshimatsui*. 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 ιζημα, 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 ιζημα (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) καολιντικής 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 (CaCO₃) για τη ρύθμιση του pH του τελικού μείγματος του ιζήματος σε $7,0 \pm 0,5$.

στ) η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα του τελικού μείγματος θα πρέπει να είναι 2 % ($\pm 0,5$ %), και να ρυθμίζεται με τη χρήση κατάλληλων ποσοτήτων τύρφης και άμμου, σύμφωνα με τα στοιχεία α) και γ).

14. Η πηγή της τύρφης, της καολιντικής 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 ιζημα είναι επαρκώς εγκλιματισμένα.

Νερό

15. Κάθε νερό που είναι σύμφωνο με τα χημικά χαρακτηριστικά του αποδεκτού νερού αραιώσης, τα οποία απαριθμούνται στα προσάρτηματα 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 χειρονομίες 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 CaCO₃. 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 Elenrdt 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 υπερκεείται του ιζήματος. Τα διαλύματα δοκιμής των επιλεγμένων συγκεντρώσεων παρασκευάζονται συνήθως με αραιώση 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 κατάλληλο 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 $\leq 0,1$ 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 χειρονομίων, 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. EC₁₅, EC₅₀) 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. Γενικά, 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 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 (εξαιρέση 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 η 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 ιδυνόντων. 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 βάρους), 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-Whitney. 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 ιζήμα 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.
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 παλιό 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 διηθημένου 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 yoshimatu*, 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 σιφόνιο, σε κάθε δοχείο δοκιμής που περιέχει το εμβολιασμένο ιζήμα 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 σιφονίου. Το υπερκείμενο νερό πρέπει στη συνέχεια να αναμειγνύεται με επιμέλεια, ώστε να μη διαταράσσεται το ιζήμα.

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 ιζήμα, 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 διαλυτή ιζήματος.

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 (εναύωρημα 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. yoshimatsui*) 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 ιζημα με ομοιοπολικούς δεσμούς, η ποσότητα τροφής που απαιτείται για να διασφαλιστεί η επιβίωση και η φυσική ανάπτυξη των οργανισμών μπορεί να προστίθεται στο μορφοποιημένο ιζημα 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. τουσκινίδας (*Urtica dioica*), μουριάς (*Morus alba*), λευκού τριφυλλίου (*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. yoshimatsui* 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.
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 ιζημα. Επίσης, καταγράφεται ο αριθμός των ορατών χρυσασπιδών 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 ιζημα 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 επιζώων προνυμφών ανά δοχείο δοκιμής και υπολογίζεται το μέσο ξηρό βάρος ανά προνύμφη ανά δοχείο. Είναι χρήσιμο να προσδιορίζεται το στάδιο ανάπτυξης των επιζώων προνυμφών. Προς τούτο μπορεί να χρησιμοποιήσει η μέτρηση του πλάτους της κεφαλικής κάμας 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/κατανόμη της ελεγχόμενης ουσίας στο σύστημα νερού-ιζήματος. Η δειματοληψία 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 ιζήμα 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.

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 συκέντρωση 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 \times 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 συνθήκες 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 συκέντρωσης, η οποία είναι μεγαλύτερη από εκείνη που θα έδειχνε μια διωνυμική κατανομή (συνήα αναφέρεται ως "εξωδιωνυμική" διασπορά), θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια ανθεκτική δοκιμή Cochran-Armitage ή Fisher exact, όπως προτείνεται στην παράγραφο (21).
47. Προσδιορίζεται το άθροισμα των χειρονόμων που εμφανίζονται ανά δοχείο, n_e , και διαιρείται διά του αριθμού των εισαγόμενων προνυμφών, n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

όπου:

ER = λόγος εμφάνισης

n_e = αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο

n_a = αριθμός προνυμφών που εισήχθησαν ανά δοχείο

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 παρουσιών 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 (\bar{x}) υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i \cdot x_i}{n_e}$$

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

$$x_i = 1 / \left(\text{ημέρα}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

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:

- ιζήμα 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·
- 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 (συνεωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους),
- μέσος ρυθμός ανάπτυξης των πλήρως αναπτυχθέντων χειρονόμων ανά επανάληψη και αγωγή (συνεωμένα 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,
- σύζηση 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. Streløkke and H. Köpp, Berlin 1995.
- (2) Fleming R *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the 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.
- (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. Statist. 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.
-

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 απομεινεί 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.

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 Elenit "M4" ή "M7", βλέπε κατωτέρω). Το νερό πρέπει να αερίζεται πριν από τη χρήση. Εάν είναι απαραίτητο, το νερό καλλιέργειας μπορεί να ανανεώνεται με έγχυση ή σιφονισμό 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 μεγαλύτερες ηλικιακές 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.

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 ζελαντινωδών 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 ενηλίκων 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 , $5 \text{ H}_2\text{O}$, 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 εμφανίζονται 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
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ (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
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	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
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (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)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	293 800	1,0	293,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	246 600	0,5	123,3

	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)
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

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

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streløkke 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.

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 σφάγγων, 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 ($\pm 0,5$)
Ανθρακικό ασβέστιο	CaCO_3 , κονιοποιημένο, χημικά καθαρό	0,05 - 0,1
Νερό	Αγωγιμότητα ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	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 $5,5 \pm 0,5$ 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 $6,0 \pm 0,5$. 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 χειρνομίδες, 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.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

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.

Προσάρτημα 4

Χημικά χαρακτηριστικά ενός αποδεκτού νερού αραίωσης

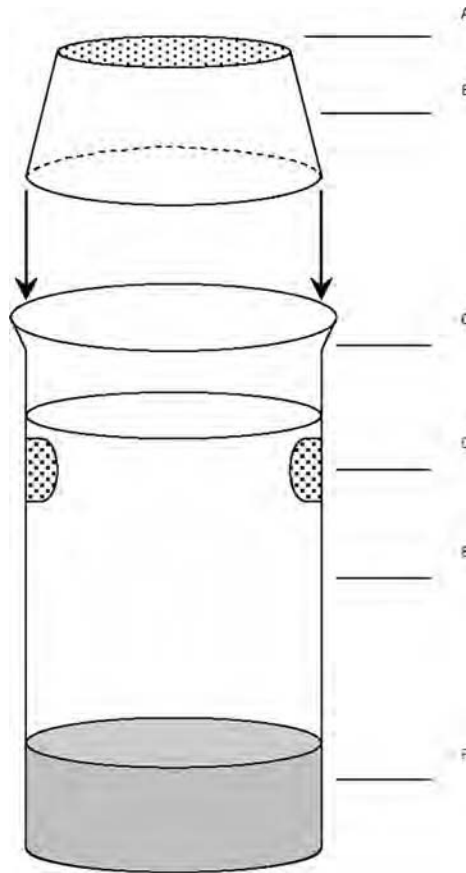
Ουσία	Συγκεντρώσεις
Σωματίδια	< 20 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	< 2 mg/l
Μη ιονισμένη αμμωνία	< 1 µg/l
Σκληρότητα ως CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Υπολείμματα χλωρίου	< 10 µg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	< 50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια	< 50 ng/l
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).

Προσάρτημα 5

Κατευθύνσεις για την παρακολούθηση της εξέδου των προνυμφών χειρονομίδων

Τοποθετούνται παγίδες εξέδου 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: νάλον σίτα | D: έξοδοι σίτας για την ανταλλαγή υδάτων |
| B: ανεστραμμένα πλαστικά ποτήρια | E: νερό |
| C: ποτήρι έκθεσης χωρίς χείλος | F: ίζημα |

Γ.29. ΑΜΕΣΗ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ — CO₂ ΣΕ ΣΦΡΑΓΙΣΜΕΝΑ ΔΟΧΕΙΑ (ΔΟΚΙΜΉ ΥΠΕΡΚΕΪΜΕΝΗΣ Φ΄ΑΣΗΣ)

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 (CO₂) (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 CO₂ αβιοτικά από οργανικές χημικές ουσίες. Στην αρχική και τροποποιημένη δοκιμή Sturm (1)(2) το CO₂ απομακρύνεται από την υγρή φάση και διοχετεύεται σε

απορροφητικά δοχεία με ψεκασμό (δηλαδή διαβίβαση φυσαλίδων αέρα μέσω του υγρού μέσου για την απομάκρυνση του CO₂), ενώ στην εκδοχή του Larson (3)(4) το CO₂ μεταφέρεται από το δοχείο αντίδρασης στους απορροφητές με τη διαβίβαση αέρα απαλλαγμένου από CO₂ μέσω του υπερκείμενου χώρου και, επιπροσθέτως, με συνεχή ανακίνηση του δοχείου δοκιμής. Η ανακίνηση του δοχείου αντίδρασης προβλέπεται μόνο στην τροποποίηση του Larson. Η ανάδειξη 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 CO₂ 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 CO₂ στις αλκαλικές παγίδες δεν δίνει μια πιστή εικόνα της ποσότητας του CO₂ που παράγεται μικροβιολογικά σε ενδιάμεσους χρόνους κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης. Κατά συνέπεια, η προδιαγραφή σύμφωνα με την οποία > 60 % της θεωρητικά μέγιστης παραγωγής CO₂ (ThCO₂) 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 ταξινομάζεται 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.
5. Τα λοιπά μειονεκτήματα της μεθοδολογίας Sturm (περίπλοκη, χρονοβόρα, πιο επιρρεπής σε πειραματικά σφάλματα και μη εφαρμόσιμα σε πτητικές χημικές ουσίες), είχαν υποκινήσει νωρίτερα την έρευνα με αντικείμενο μια τεχνική με φθορισμό αναερόβιας βιοαποικοδόμησης (10)(11). Οι Boatman et al. (12) επανεξέτασαν τις προηγούμενες μεθόδους και υιοθέτησαν ένα κλειστό σύστημα υπερκείμενης φάσης, στο οποίο το CO₂ ελευθερωνόταν εντός του υπερκείμενου χώρου στο τέλος της επώασης με οξίνιση του μέσου. Το CO₂ μετρούταν με ανάλυση αεριοχρωματογραφίας (GC)/IC σε αυτομάτως λαμβανόμενα δείγματα της υπερκείμενης φάσης, αλλά δεν συνυπολογίζονταν 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 CO₂ 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 CO₂.
7. Οι δύο προσεγγίσεις συνδυάστηκαν στο πρότυπο υπερκείμενης φάσης CO₂ 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 CO₂, συγκεκριμένα του CO₂ στον υπερκείμενο χώρο μετά από την οξίνιση (13) και του IC στην υγρή φάση, μετά από την προσθήκη περιόσσειας 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 δοκιμής 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 CO₂ 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).

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 $50 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ 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 εργασιών
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 δόσολογίας, 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 εμπόδιο.

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 εργασιών
Βενζολοσουλφονικό τετραπροπυλένιο	17	45	10
Σουλφονηλεκτρικό διισοκτύλιο (ανιονικό)	72	22	9
Χλωριούχο δεκαεξυλοτριμεθυλαμμώνιο (*) (κατιονικό)	75	13	10

Ελεγχόμενη χημική ουσία	Μέσο ποσοστό βιοαποικοδόμησης (28 ημέρες)	Συντελεστής μεταβλητότητας (%)	Αριθμός εργαστηρίων
Ισο-εννεύλοφαινόλη (αιθοξυλιωμένη) ₉ (μη ιονικό)	41	32	10
Αμιδο-κοκο-προπυλο-διμεθυλυδροξυ-σουλφοβεταΐνη (επαμφοτερίζον)	60	23	11

(*) Προστέθηκε SiO₂ 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:

- 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·
- αναλυτής άνθρακα ή άλλο όργανο (π.χ. αεριοχρωματογράφος) για τη μέτρηση του ανόργανου άνθρακα·
- σύριγγες μεγάλης ακρίβειας για αέρια και υγρά δείγματα·
- τάρακτρο σε περιβάλλον ελεγχόμενης θερμοκρασίας·
- παροχή αέρα απαλλαγμένου από CO₂ — μπορεί να επιτευχθεί με τη διοχέτευση αέρα μέσω κόκκων καυστικής σόδας ή με τη χρήση μείγματος αερίων 80 % N₂ / 20 % O₂ (προαιρετικά) (βλέπε παράγραφο 28)·
- συσσκευή διήθησης με μεμβράνη πορώδους 0,20-0,45 μm (προαιρετικά)·
- 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 (K_2HPO_4) 8,50 g

Όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4) 21,75 g

Διένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 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 ($\pm 0,2$). Σε αντίθετη περίπτωση, παρασκευάζεται νέο διάλυμα.

β) Διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36,40 g

Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1 λίτρο.

γ) Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22,50 g

Διάλυση σε νερό και συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1 λίτρο.

δ) Εξαένυδρος χλωριούχος σίδηρος (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 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).

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 επίδρασης 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).

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 CO₂ 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 mm²) 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 αναστολές, 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 αναμεικτή 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.
32. Περαιτέρω μείωση της έκλυσης CO₂ στο τυφλό μπορεί να επιτευχθεί με ολονύκτιο αερισμό της ιλύος με αέρα απαλλαγμένο από CO₂. 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 CO₂ [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 συσσωρευμένος 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 CO₂. Ο προεγκλιματισμός συνίσταται από τον αερισμό της ενεργού ιλύος μετά από αραίωση σε μέσο δοκιμής σε 30 mg/l με υγρό αέρα απαλλαγμένο από CO₂ 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.

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 καταλλήλου επεξεργασμένης ενεργού ιλύος (παράγραφος 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 οποιοδήποτε τύπου εμβολίου, πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την επαρκή ανάμειξη του εμβολιασμένου μέσου, ώστε να εξασφαλιστεί 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 πιητικές 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.
47. Όλες οι φιάλες στη συνέχεια σφραγίζονται, για παράδειγμα, με διαφράγματα από ελαστικό βουτυλίου και πόματα αλουμινίου. Σε αυτό το στάδιο, θα πρέπει να προστίθενται οι πιητικές 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 αναμειγνύμενο και σε εναιώρημα (π.χ. 150 έως 200 στροφές ανά λεπτό), και επωάζονται στο σκοτάδι, στους $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 οριζόντιωση 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 CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ σε N₂). 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.

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 CO₂ 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 (Na₂CO₃) σε απαλλαγμένο από CO₂ νερό, το οποίο παρασκευάζεται με οξίνιση νερού μέχρι pH 6,5 με πυκνό ορθοφωσφορικό οξύ (παράγραφος 20), ολονύκτιο ψεκασμό με απαλλαγμένο από CO₂ 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 αερίας 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 CO₂ σε ανθρακικό άλας

55. Πριν από κάθε παρτίδα αναλύσεων, ο αναλυτής IC βαθμονομείται με κατάλληλο πρότυπο – για παράδειγμα, διάλυμα οξίνου ανθρακικού νατρίου (NaHCO₃) σε νερό απαλλαγμένο από CO₂ (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 αλκάλειου 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 CO₂ 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.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

58. Εάν επιτυγχάνεται 100 % ανοργανοποίηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε CO₂, 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:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}.$$

Η συνολική μάζα (mg) του ανόργανου άνθρακα (TIC) εντός κάθε φιάλης είναι:

$$\text{TIC} = (\text{mg C στο υγρό} + \text{mg C στον υπερκείμενο χώρο}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Εξίσωση [1]}$$

όπου:

V_L = όγκος του υγρού μέσα στη φιάλη (σε λίτρα),

C_L = συγκέντρωση του IC στο υγρό (mg/l ως άνθρακας),

V_H = όγκος υπερκείμενης αέριας φάσης (headspace) (σε λίτρα),

C_H = 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:

$$\%D = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100 \quad \text{Εξίσωση [2]}$$

όπου:

TIC_t = mg TIC στη φιάλη δοκιμής στον χρόνο t ,

TIC_b = 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_C) 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] $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, όπου V_B = όγκος της φιάλης ορού.

Μετατροπή του CO₂ 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 $TIC = V_L \times C_L$.

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, σχήμα 1). 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, χρησιμοποιείται για να δείξει την ακρίβεια με την οποία προσδιορίστηκε 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 εξηγήσει τις χαμηλές τιμές του D_{FI} 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.

Έγκυρότητα 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.

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 λύου 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.

(1) Η ποσοστιαία αποικοδόμηση στα δοχεία F_C που περιέχουν την ουσία αναφοράς.

(2) Η ποσοστιαία αποικοδόμηση στα δοχεία F_I .

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 προσμειξεις) 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 προ-επεξεργασία και προεγκλιματισμός,
- θερμοκρασία επώασης,
- εγκυρότητα της αρχής της ανάλυσης IC,
- κύρια χαρακτηριστικά του αναλυτή IC που χρησιμοποιείται (και οποιοσδήποτε άλλες αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται),
- πλήθος πολλαπλών δοχείων (replicates).

Αποτελέσματα:

- ανεπεξέργαστα δεδομένα και υπολογισμένες τιμές της βιοαποικοδομησιμότητας σε μορφή πίνακα,
- 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,
- σύζηση των αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- (1) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός “άμεσης” βιοαποικοδομησιμότητας – Δοκιμή έκλυσης CO₂ (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.
- (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 (CO₂ headspace test).
- (17) Battersby N.S. (1997), The ISO headspace CO₂ 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 CO₂ 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.
-

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

ThCO₂: 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 αναργανοποιείται 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 CO₂ και H₂O υπό αερόβιες συνθήκες και προς CH₄, CO₂ και H₂O 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).

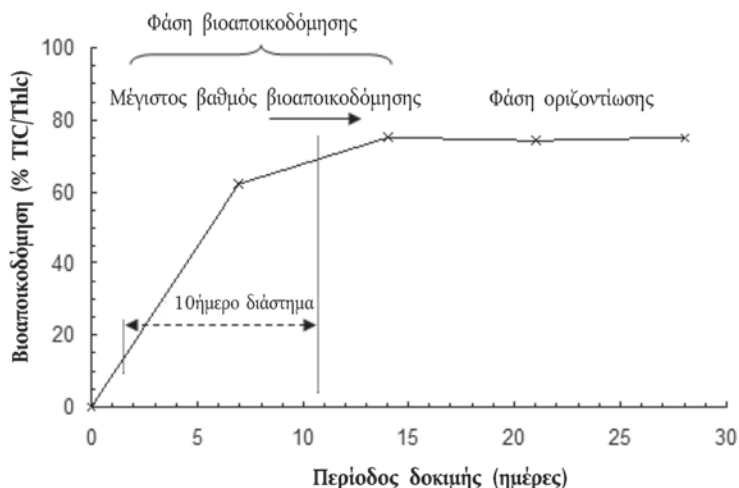
Φάση αποικοδόμησης: Ο χρόνος που μεσολαβεί από το τέλος της λανθάνουσας περιόδου έως ότου επιτευχθεί το 90 % του μέγιστου βαθμού αποικοδόμησης.

Φάση οριζοντίωσης: Οριζοντίωση είναι η φάση κατά την οποία έχει επιτευχθεί η μέγιστη αποικοδόμηση και η καμπύλη βιοαποικοδόμησης έχει σταθεροποιηθεί.

Προσάρτημα 2

Παράδειγμα καμπύλης βιοαποικοδόμησης

Σχήμα 1

Βιοαποικοδόμηση οκτανόλης-1 στη δοκιμή υπερκείμενης φάσης CO₂

Γλωσσάριο

Βιοαποικοδόμηση

Φάση βιοαποικοδόμησης

Μέγιστος βαθμός βιοαποικοδόμησης

Φάση οριζόντιωσης

10ήμερο διάστημα

Περίοδος δοκιμής (ημέρες)

Γ. 30. ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΕ ΧΕΡΣΑΙΟΥΣ ΟΛΙΓΟΧΑΙΤΟΥΣ (OLIGOCHAETA)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ (ΓΓ) 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 γχυστοειδή.

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 $\log K_{ow}$ 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),
 - 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) γωστοί μεταβολίτες.

7. Μπορούν να χρησιμοποιούνται ραδιοσημασμένες ή μη ραδιοσημασμένες ελεγχόμενες χημικές ουσίες. Ωστόσο, για να διευκολυνθεί 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 (EC_x) ή θανατηφόρος συγκέντρωση (LC_x) 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 LC₅₀ 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 υποθανηφόρα καταληκτικά σημεία (51)(52). Εάν τα στοιχεία αυτά δεν είναι διαθέσιμα, χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να προκύψουν από δοκιμή οξείας τοξικότητας [βλέπε π.χ. (23)].
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 ¹⁴C 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 προσέλευση 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 σκώληκες στο τέλος της φάσης αποβολής αναφέρεται ως μη αποβληθέντα υπολείμματα. Ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης σταθερής κατάστασης (BAF_s) υπολογίζεται, κατά προτίμηση, τόσο ως ο λόγος των συγκεντρώσεων στους σκώληκες (Ca) και στο έδαφος (Cs) σε φανόμενη σταθερή κατάσταση, όσο και ως συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης, BAFk, ως ο λόγος της σταθερής ταχύτητας πρόσληψης από το έδαφος (k_s) προς τη σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e) (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 (συντελεστής 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.

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 χημικά αδρανές υλικό και με κατάλληλη χωρητικότητα ανάλογα με τον βαθμό φόρτισης, δηλαδή τον 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 σιλιανωμένου 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 πύσης αερίου) που περιέχουν κατάλληλα απορροφητικά υλικά.

Έδαφος

20. Το έδαφος δοκιμής πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε οι οργανισμοί δοκιμής να μπορούν να επιβιώσουν 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 αερόζηρο 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 (WHC_{max}) 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 περισσότερων 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 επι-
στροφόμενο κλάσμα μπορεί στη συνέχεια να αναμιχθεί 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 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 αναμειγμένος 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
πιητικότητα 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 ιγδίου 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 αποιονισμένου 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 παρασκευά-
ζεται 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 οικογέ-
νειας *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.
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 προγραμματίων
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 απαραί-
τητη 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 προστίθε-
νται 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 albidus*) 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 αποτιθενται 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 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 υποτιθέεται 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 $20 \pm 2^\circ \text{C}$ 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 (EC₅₀) 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.

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 αποιονισμένου 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 εξασφαλιζονται 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 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$).
47. Κατά τη φάση αποβολής, οι σκώληκες αντικαθιστούν το μολυσμένο περιεχόμενο του εντέρου με καθαρό χόμα. 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 υποτιθεται 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.
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 ($\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$).
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 οποίο 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.

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 οριζόντιωση ή σταθερή κατάσταση (βλέπε ορισμούς στο προσάρτημα 1), ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης σε σταθερή κατάσταση, BAF_{ss}, 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 BAF_{ss} 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. EC₅₀, LC₅₀, 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 προηγήθιστα αγωγή, εγκλιματισμός, ηλικία, εύρος μεγεθών κ.λπ.

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 σκωλήκες 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 εμφανίζεται 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 -έδαφος 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),
- εάν έχουν μετρηθεί: εκατοστιαίες αναλογίες της μητρικής χημικής ουσίας, των μεταβολιτών και των δευτερευμένων 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. Physiol.* 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.
- (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.
- (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. & Eisen-träger, 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 ¹⁴C-Hexachlorbenzol und ¹⁴C-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.
- (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 Oligochaetes, 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-Koeffizienten 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 (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida), *Carolinae* 57: 93-100.
- (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 non-persistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402-406.

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 της χημικής ουσίας αποκλειστικά από το περιβάλλον μέσο (δηλαδή μέσω της επιφάνειας του 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 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 **οριζόντιωση** 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, ενδείκνυται 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 $\text{g εδάφους}\cdot\text{kg}^{-1}$ σκόληκα· 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 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ξηρού βάρους σκόληκα) διά της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο (C_s , σε $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ξηρού βάρους εδάφους) και εκφράζεται σε $\text{kg}\cdot\text{εδάφους}\cdot\text{kg}^{-1}$ σκόληκα.

Συντελεστής βιοσυσσώρευσης σε σταθερή κατάσταση (BAF_{ss}) 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 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 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).

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 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ λιπιδίου περιεχομένου του οργανισμού και η C_s σε $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ περιεκτικότητας του εδάφους σε οργανικό άνθρακα. Ο BSAF εκφράζεται σε $\text{kg OC}\cdot\text{kg}^{-1}$ 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.

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:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{εξίσωση 1}]$$

ή

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{εξίσωση 2}]$$

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]

k_e = σταθερά ταχύτητας αποβολής [ημέρα⁻¹]

t_c = 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:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{εξίσωση 3}]$$

και

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{εξίσωση 4}]$$

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):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad [\text{εξίσωση 5}]$$

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]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{εξίσωση 6}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad [\text{εξίσωση 7}]$$

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]

k_e = 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

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k} e^t) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{εξίσωση 1}]$$

μπορεί να απλοποιηθεί σε:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ή

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad [\text{εξίσωση 8}]$$

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:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad [\text{εξίσωση 9}]$$

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.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{εξίσωση 10}]$$

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 εμφανίζεται 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)].

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
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 την 3η ημέρα
17	Ομοίως με την 1η ημέρα
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)

Ημέρα	Δραστηριότητα
- 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
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).

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 επιβιώσουν, 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 αναμεικτή 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 \pm 0,5), προστίθεται στο έδαφος επαρκής ποσότητα CaCO₃ 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).

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.

Προσάρτημα 5

Είδη χερσαίων ολιγοχαιτών 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 μεσοστηματικές 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 σχετικά 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 καλλιέργειά 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 σκώληκων 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. Landwirtschaft*. 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.

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 γαιοσκώληκων 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 σκώληκων μικρού μεγέθους) τα οποία πληρούνται με ένα μείγμα τεχνητού εδάφους και διαθέσιμου στο εμπόριο, μη μολυσμένου 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.

Οι σκώληκες θα πρέπει να σπίζονται 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 πρόσφατως 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. *Glyzyrhagus* 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 στυλπνή 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 nitroheterocyclic 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.