

Ocena tveganja za zdravje potrošnikov zaradi izpostavljenosti ostankom zdravil za uporabo v veterinarski medicini v medu in satju

Naročnik: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin

Izvajalec: Nacionalni inštitut za javno zdravje v sodelovanju s
Slovenskim toksikološkim društvom
Nacionalnim inštitutom za biologijo
Fakulteto za farmacijo in
Medicinsko fakulteto Univerze v Ljubljani

Ljubljana, februar 2016



Univerza v Ljubljani
Medicinska Fakulteta



Univerza
v Ljubljani
Fakulteta
za farmacijo



Ocena tveganja za zdravje potrošnikov zaradi izpostavljenosti ostankom **zdravil za uporabo v veterinarski medicini** v medu in satju

Risk assessment for consumer health from exposure to residues of substances used as veterinary medicines in honey and honeycomb

Dr. Tanja Fatur¹, univ. dipl. mikrobiol.

Dr. Jernej Kužner², dr. med. vet.

Izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič³, mag. farm.

Prof. dr. Mojca Kržan⁴, dr. med.

Prof. dr. Metka Filipič⁵, univ. dipl. inž. živil. tehnol.

Dr. Lucija Perharič¹, dr. med., spec. int., ERT

¹ Center za zdravstveno ekologijo, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Zaloška 29, 1000 Ljubljana

² Slovensko toksikološko društvo, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

³Katedra za farmacevtsko kemijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva 6, 1000 Ljubljana

⁴ Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljana, Korytkova 2, 1000 Ljubljana

⁵ Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

Povzetek

Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin je v posebnem nadzoru nad proizvodnjo, prometom in uporabo pripravkov za zatiranje varoj odkrila, da so nekateri slovenski čebelarji za zdravljenje čebeljih družin uporabljali ilegalno proizvedena zdravila, ki so vsebovala aktivne učinkovine amitraz, klorfenvinfos in rotenon. Ob tem se je pozornost in zaskrbljenost javnosti usmerila na morebitno tveganje za zdravje potrošnikov zaradi uživanja medu. Na Nacionalnem inštitutu za javno zdravje smo pripravili preliminarno oceno tveganja, ki je pokazala, da uživanje analiziranega medu ne predstavlja tveganja za zdravje. V medu namenjenemu za prodajo so pri analizah ugotovili prisotnost amitraza, medtem ko so bili ostanki vseh ostalih kemikalij v medu pod mejo določanja. Zakonsko dovoljena mejna vrednost ostankov amitraza kot zdravila za uporabo v veterinarski medicini je 0,2 mg/kg medu, kar predstavlja približno 3 % sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI) za vseživljenjsko izpostavljenost odraslega in 10 % sprejemljivega dnevnega vnosa za vseživljenjsko izpostavljenost otroka s telesno maso 10 kg. Iz tega sledi, da bi bilo nadaljnje rafiniranje ocene tveganja nepotrebno, saj so bili ostanki vseh drugih kemikalij, ki bi iz ilegalno proizvedenega zdravila za čebele lahko prehajale v med pod mejo določanja. Predpisane meje ostankov v hrani so po pravilu mnogo nižje od odmerkov, ki bi lahko predstavljali tveganje za zdravje.

Zaradi nenatančnih in zastrašujočih interpretacij analitskih rezultatov, ki so bile verjetno posledica nezadostnega razumevanja procesa ocene tveganja in principov določanja mejnih vrednosti ostankov, smo napravili rafinirano oceno tveganja za ostanke amitraza zaradi uživanja medu, za ostanke amitraza in klorfenvinfosa zaradi žvečenju satja (voska) ter opredelili morebitne interakcije med amitrazom in klorfenvinfosom. Pri izdelavi rafinirane ocene tveganja so sodelovali tudi eksperti iz drugih institucij.

Odrasli s telesno maso 60 kg bi ob uživanju 40 g medu (ekstremni jedec) s koncentracijo amitraza 0,14 mg/kg medu zaužil 100 krat manjši odmerek amitraza, kot je referenčna vrednost za kratkotrajni vnos (ARfD znaša 0,01 mg/kg/tm/dan) in 30 krat manjši odmerek kot je sprejemljivi dnevni vnos za dolgotrajno (vseživljenjsko) izpostavljenost (ADI znaša 0,003 mg/kg tm/dan). Otrok s telesno maso 10 kg bi ob uživanju 20 g medu (ekstremni jedec) s koncentracijo amitraza 0,14 mg/kg medu, zaužil 30-krat manjši odmerek amitraza, kot je referenčna vrednost za enkratni vnos in 10-krat manjši odmerek kot je sprejemljivi dnevni vnos za dolgotrajno izpostavljenost. Med z ostanki amitraza ne predstavlja tveganja za zdravje odraslih niti za zdravje otrok, ne pri kratkotrajnem ne pri dolgotrajnem uživanju.

Odmerki brez ugotovljenega učinka (NOAEL), ki so bili podlaga za določitev referenčnih vrednosti (ARfD in ADI) za amitraz so manjši od NOAEL za učinke na endokrini sistem in razmnoževanje, tako da glede na do sedaj znane podatke in mednarodno uveljavljene postopke za izvedbo ocen tveganja za zdravje ljudi lahko zaključimo, da so trenutno veljavni referenčni odmerki dovolj nizki tudi v povezavi z morebitnim motenjem hormonskega ravnovesja.

Klorfenvinfos je bil ugotovljen v satju (vosku), medtem ko so bile njegove koncentracije v medu pod mejo določanja. To je pričakovano glede na fizikalno-kemijske lastnosti klorfenvinfos in rezultatov študij prehajanja klorfenvinfos iz voska v med. Vendar nekateri potrošniki žvečijo satje (vosek). Ocenili smo, da bi lahko odrasla oseba naenkrat oz. v krajšem časovnem obdobju (do 14 dni) brez tveganja za zdravje dnevno požvečila 169 g satja, otrok starosti treh do deset let 65 g, otrok od enega do treh let 28 g. V primeru dolgoročnega žvečenja satja bi brez tveganja za zdravje odrasla oseba

lahko dnevno požvečila 42 g, otrok starosti tri do deset let 16 g satja, otrok star od enega do treh let 7 g satja, ki bi vsebovalo najvišjo izmerjeno količino klorfenvinfos a v satju, to je 0,71 mg/kg.

Ocenili smo količino voska (satja) z ostanki amitraza in klorfenvinfos a, ki bi ga lahko brez tveganja za zdravje prežvečili odrasli in otroci naenkrat oz. v krajšem časovnem obdobju (14 dni) ali dolgoročno, vsak dan, tekom vsega življenja ob predpostavki, da bi ostanki v celoti prehajali iz voska v slino. Ker je klorfenvinfos slabo topen v vodi, zaradi česar ni prehajal v med, sklepamo, da bi bilo podobno tudi s prehajanjem klorfenvinfos a iz voska (satja) v slino. Zato menimo, da so relevantnejše količine voska, ki smo jih izračunali kot sprejemljive zaradi vsebnosti amitraza, in sicer bi odrasli smeli požvečiti v krajšem časovnem obdobju 146 g voska (satja)/dan, majhni otroci pa 24 g/dan, medtem ko bi odrasli smeli dolgoročno požvečiti 44 g/dan, majhni otroci pa 4 g/dan,

Po do sedaj znanih podatkih bi glede na mehanizme delovanja amitraza in klorfenvinfos a in njune toksikokinetike pri hkratni izpostavljenosti lahko prišlo do potenciranja določenih učinkov, medtem ko bi se določeni učinki ob hkratni izpostavljenosti lahko zmanjšali oziroma izničili. Amitraz in klorfenvinfos se izločata iz organizma pretežno z urinom v obliki številnih metabolitov. Oba se obsežno metabolizirata v jetrih s citokromi P450, vendar glede na dosedaj znane podatke, ne moremo zaključiti, da obstajajo med njima biološko pomembne interakcije.

Da bi do največje možne mere zmanjšali zaskrbljenost potrošnikov, do katere je v konkretnem primeru prišlo predvsem zaradi nepreciznega in neusklajenega komuniciranja predlagamo vzpostavitev jasnih komunikacijskih poti med institucijami, ki so pristojne za nadzor in analizo tveganja (ocena tveganja, upravljanje s tveganjem, komunikacija tveganja). Poleg tega predlagamo, da se izvajanje ocen tveganja za zdravje ljudi sistemsko reši na medresorski ravni.

Menimo, da zaključki ocene tveganja ne smejo vplivati na ukrepe v zvezi s proizvodnjo in uporabo ilegalnega pripravka za zdravljenje varoj. Pripravek ni bil razvit, izdelan, analiziran, distribuiran in uporabljen skladno z zakonodajo in smernicami s področja zdravil za uporabo v veterinarski medicini, ki morajo biti varna, učinkovita in kakovostna. Ilegalno proizvedeno zdravilo ne ustreza zahtevanim standardom kakovosti in se ne sme uporabljati v praksi.

Zahvala: Prof. dr. Valentinu Skubicu, dr. med. vet. se najlepše zahvaljujemo za pripombe.

Summary

During a special inspection on production, trade and use of the products for the control of *Varroa* mites, the Administration of the Republic of Slovenia for Food Safety, Veterinary and Plant Protection discovered that some of the Slovenian bee-keepers had been using illegally manufactured veterinary medicinal product containing amitraz, chlorfenvinphos and rotenone for the treatment of their bee families. The attention and the concerns of the public turned towards an eventual risk for consumer health which could have resulted from the consumption of honey. A preliminary risk assessment carried out at the National Institute of Public Health showed that the consumption of the analyzed honey did not present a risk to health. The analyses of the honey intended for human consumption discovered the presence of amitraz (up to 0.14 mg/kg) while the residues of all other chemicals were below the level of determination (LOD). Legally permitted maximum residue level (MRL) of amitraz used as a veterinary medicine is 0.2 mg/kg. This represents approximately 3% of the acceptable daily intake for lifelong exposure (ADI) of an adult and 10% of ADI for a 10 kg child. Hence it followed that a further refinement of risk assessment would not have been required as the residues of all other chemicals which could have migrated into honey from the illegally produced veterinary medicinal product were below the LODs. Further, MRLs prescribed in foods are as a rule much lower from the doses which could pose a risk to health.

Owing to imprecise and intimidating interpretations of the analytical results which were probably due to insufficient understanding of the risk assessment procedure and the principles of setting the MRLs, our preliminary risk assessment was refined in collaboration with the experts from other institutions. We assessed the risk from the ingestion of honey containing 0.14 mg of amitraz/kg, from chewing honeycomb (wax) containing 4.1 mg of amitraz/kg and 0.71 mg of chlorfenvinphos/kg, as well as the interactions between amitraz and chlorfenvinphos.

The extreme daily consumption of honey in an adult weighing 60 kg amounts to 40 g. Thus the exposure of an adult to amitraz from honey would be 100 times lower than the acute reference dose (ARfD) for amitraz which is 0.01 mg/kg bw/day; and 30 times lower than the ADI for amitraz, which is 0.003 mg/kg bw/day. The extreme daily consumption of honey in a toddler weighing 10 kg amounts to 20 g. The exposure of a toddler to amitraz from honey would be 30 times lower than the ARfD and 10 times lower than ADI. Honey with residues of amitraz does not pose a risk to health of adults or toddlers neither following the short-term nor the long-term exposure.

The NOAELs (No Observed Adverse Effect Levels) used for setting the ARfD and ADI for amitraz were lower than the NOAELs for reproduction and the effects on the endocrine system. Taking into account the available data and the internationally recognised risk assessment procedures we concluded, that the current reference values are low enough concerning the potential endocrine disrupting properties of amitraz.

Chlorfenvinphos was found in honeycomb (wax) while its concentrations in honey were below LOD. This is expected considering the physico-chemical properties of chlorfenvinphos and the results of studies on the migration of chlorfenvinphos from wax to honey. However, as some consumers chew honeycomb, we estimated the amounts of honeycomb containing 0.71 mg of chlorfenvinphos/kg which the consumers could chew without an appreciable risk to health. On a short-term basis an adult could chew 169 grams of honeycomb/day, a child aged 3 to 10 years 65 g/day, a toddler 28 g/day; on a

long-term basis an adult could chew 42 g of honeycomb/day, a child aged 3 to 10 years 16 g/day, a toddler 7 g/day.

In view of the facts, that chlorfenvinphos is poorly soluble in water and has not migrated into honey; we concluded that it would be unlikely for chlorfenvinphos to migrate from the honeycomb (wax) into saliva during chewing. Therefore, we believe that the estimates related to amitraz residues in honeycomb may be more relevant. On a short-term basis an adult could chew 146 grams of honeycomb/day, a toddler 24 g/day; on a long-term basis an adult could chew 44 g of honeycomb/day, and a toddler 4 g of honeycomb/day containing 4.1 mg of amitraz/kg.

Taking into account the available data on the mechanisms of action and the toxicokinetics of amitraz and chlorfenvinphos we suggest that a combined exposure might result in potentiating some of the effects and in antagonism of others. Both, amitraz and chlorfenvinphos are well metabolised in the liver to a number of metabolites which are excreted predominantly in the urine. Considering the available data we are not able to conclude, that the interactions of amitraz and chlorfenvinphos would be biologically significant.

The public concern in this case was mainly caused by the imprecise and unharmonized risk communication. In order to reduce such concerns in the future, as much as possible, we propose, firstly establishing of clear communication pathways among the competent institutions involved in the risk analysis (risk assessment, risk management, risk communication), and secondly a systemic support to risk assessment for human health on the inter-sectorial level.

We believe that the conclusions of this risk assessment should not influence the measures concerning the illegal production and use of the veterinary medicinal product for the treatment of *Varroa* mites. The product has not been developed, manufactured, analyzed, distributed or used, according to the current legislation and guidance for veterinary medical products with regard to its quality, efficacy and safety. The illegally manufactured product does not comply with the required standards of quality and it should not be used.

Acknowledgement: We are grateful to Prof. dr. Valentin Skubic for his comments.

Kazalo

Seznam okrajšav	10
1. Opredelitev problema	11
1.1 Ilegalna proizvodnja pripravkov za zatiranje varoj	11
1.2 Določitev velikosti vzorca	11
1.3 Rezultati laboratorijskih analiz	12
1.4 Komunikacija rezultatov analiz	13
2. Ocena tveganja	15
2.1 Ocena nevarnosti	15
2.1.1 Amitraz	15
2.1.1.1 Fizikalno kemijske lastnosti	15
2.1.1.2. Mehanizem delovanja	16
2.1.1.3 Absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje pri sesalcih	16
2.1.1.4 Strupenost	16
2.1.1.4.1 Lokalni učinki	17
2.1.1.4.2 Akutna strupenost	17
2.1.1.4.3 Genotoksičnost	17
2.1.1.4.4 Kronična strupenost	18
2.1.1.4.4.1 Učinki pri študijah ponavljajoče se izpostavljenosti in študijah rakotvornosti	18
2.1.1.4.4.2 Učinki na endokrini (hormonski) sistem	18
2.1.1.4.4.3 Učinki na imunski sistem	19
2.1.1.4.4.4 Učinki na živčni sistem	19
2.1.1.4.5 Učinki na razmnoževanje in potomstvo	19
2.1.1.4.6 Strupenost metabolita N-2,4-dimetilfenil-N-metilformamidina	20
2.1.1.4.7 Razvrstitev	20
2.1.1.4.8 Kritični odmerek in referenčni (varni) odmerki	20
2.1.2 Klorfenvinfos	22
2.1.2.1 Fizikalno kemijske lastnosti	22
2.1.2.3 Absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje pri sesalcih	23
2.1.2.3.1 Interakcije z drugimi kemikalijami	24
2.1.2.4 Strupenost	24
2.1.2.4.1 Lokalni učinki	24
2.1.2.4.2 Akutna strupenost	25

2.1.2.4.3 Genotoksičnost	25
2.1.2.4.4 Kronična strupenost.....	26
2.1.2.4.4.1 Učinki pri študijah ponavljajoče se izpostavljenosti in študijah rakotvornosti	26
2.1.2.4.4.2 Učinki na endokrini (hormonski) sistem	26
2.1.2.4.4.3 Učinki na imunski sistem	26
2.1.2.4.4.4 Učinki na živčni sistem.....	26
2.1.2.4.5 Učinki na razmnoževanje in potomstvo	27
2.1.2.4.6 Razvrstitev	28
2.1.2.4.7 Kritični odmerek in referenčni (varni) odmerki	28
2.2 Ocena izpostavljenosti.....	28
2.2.1 Količina zaužitega medu	28
2.2.2 Količina prežvečenega satja (voska)	29
2.2.3 Izpostavljenost amitrazu pri uživanju medu.....	29
2.2.4 Izpostavljenost amitrazu pri žvečenju voska/satja.....	29
2.2.5 Izpostavljenost klorfenvinfosu pri uživanju medu	29
2.2.6 Izpostavljenost klorfenvinfosu pri žvečenju voska/satja	29
2.3 Ocena tveganja	30
2.3.1 Ocena tveganja za amitraz v medu.....	30
2.3.1.1 Odrasli	30
2.3.1.2 Otroci.....	30
2.3.2 Ocena tveganja za amitraz v vosku (satju)	30
2.3.2.1 Sprejemljiva količina prežvečenega voska (satja) za odrasle.....	30
2.3.2.2 Sprejemljiva količina prežvečenega voska (satja) za otroke	31
2.3.3 Ocena tveganja za klorfenvinfos v vosku (satju).....	31
2.3.3.1 Sprejemljiva količina prežvečenega voska (satja) za odrasle.....	31
2.3.3.2 Sprejemljiva količina prežvečenega voska (satja) za otroke	31
2.3.4 Ocena tveganja zmesi	32
2.3.4.2 Ocena tveganja za interakcije med amitrazom in klorfenvinfosom	33
3. Ovrednotenje ocene tveganja	34
3.1 Negotovosti	34
4. Zaključek in priporočila	35
5. Viri	36
Priloga 1	40
Tabela 1: Rezultati analiz medu namenjenega za prodajo (720 ml kozarci) – koncentracije kemikalij so izražene v miligramih na kilogram medu	40

Tabela 2: Rezultati analiz voska/satja – koncentracije kemikalij so izražene v miligramih na kilogram voska	42
Tabela 3: Rezultati analiz medu natočenega iz vzorcev satje z medom – koncentracije kemikalij so izražene v miligramih na kilogram medu	43
Tabela 4: Pregled rezultatov študij akutne toksičnosti s klorfenvinfosom.....	44
Slika 1: Možne presnovne poti amitraza	45
Slika 2: Možne presnovne poti klorfenvinfosa	46

Seznam okrajšav

AChE – acetilholin esteraza
ADI – sprejemljivi dnevni vnos
ARfD – akutni referenčni odmerek
CAS št. – identifikacijska številka kemikalije
CHO – ovarijske celice kitajskega hrčka
CYP 450 – encimski sistem citokromov P450
DA – dopamin
DLP – dobra laboratorijska praksa
DNK – deoksiribonukleinska kislina
ECHA – Evropska agencija za kemikalije
ED – učinkoviti odmerek
EFSA – Evropska agencija za varno hrano
ES – Evropska skupnost
IC – inhibitorna koncentracija
5HT – 5 hidroksi triptamin
LD₅₀ – smrtni odmerek za 50% poskusnih živali
LOEL – najnižji odmerek, pri katerem so ugotovili učinek
LOAEL – najnižji odmerek, pri katerem so ugotovili škodljivi učinek
Log Kow – porazdelitveni količnik med oktanolom in vodo
MAO – monoamino oksidaza
NOAEL – odmerek pri katerem niso ugotovili škodljivega učinka
MVO – mejna vrednost ostankov
NA – noradrenalin
NIJZ – Nacionalni inštitut za javno zdravje
NLZOH – Nacionalni laboratorij za zdravje, oklje in hrano
PG – prostaglandin
pKa – disociacijska konstanta
ppm – delov na milijon
tm – telesna masa
UVHVVR – Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin

1. Opredelitev problema

1.1 Ilegalna proizvodnja pripravkov za zatiranje varoj

Sredi decembra 2015 je Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) objavila Poročilo o posebnem nadzoru nad proizvodnjo, prometom in uporabo pripravkov za zatiranje varoj (*Varroa* sp.) v letu 2015 (Bizjak, 2015). Poročilo razkriva podatke o ilegalni proizvodnji in prodaji zdravnih pripravkov, proizvajalca Apis M&D, za zatiranje varoj pri čebelah. Analizo kartonskih paličic, ki so bile nosilke zdravila so naredili v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH). Analize so pokazale, da so paličice vsebovale: amitraz, tefrozin (razgradni produkt rotenona) in klorfenvinfos kot aktivne učinkovine. Amitraz je dovoljen za uporabo v pripravkih za zdravljenje čebel v Evropski skupnosti (ES), rotenon in klorfenvinfos pa ne. Poleg aktivnih učinkovin so paličice vsebovale še organska topila (ksilen, naftalen), nečistote organskih topil (etilbenzen, trimetilbenzen, pentametilbenzen, metilnaftalen, dimetilnaftalen) in dimetilftalat, ki je posledica neustreznega pakiranja.

UVHVVR je odvzela vzorce medu in satja z medom pri dvajsetih čebelarjih, pri katerih je obstajal utemeljen sum, da so prejeli in uporabljali prepovedana zdravila.

1.2 Določitev velikosti vzorca

Pri določitvi velikosti vzorca so upoštevali, da je v Sloveniji približno 10.000 čebelarjev in 168.000 čebeljih družin ter naslednja dejstva in predpostavke:

- 2200 čebelarjev (22 % vseh) je kupilo zdravila za 75.000 čebeljih družin pri Nacionalnem veterinarskem inštitutu.
- Ob inšpekcijskem pregledu je bila na lokaciji Apis M&D d.o.o. najdena zaloga zdravil za zdravljenje približno 85.000 čebeljih družin.
- 0,03 % je ekoloških pridelovalcev medu (40), kar znaša približno 700 čebeljih družin, za katere so predvidevali, da imajo neoporečen med.
- Inšpekcijski pregled pri Apis M&D d.o.o. je pokazal, da je od 1. januarja 2013 do 16. julija 2015 bilo poslanih poštnih pošiljk 2474.
- Predvidevali so, da je bila porabljena vsaj polovica zdravil, ki jih je Apis M&D d.o.o. imel na zalogi, iz česar izhaja, da je bilo z zdravilom zdravljenih vsaj 42.000 čebeljih družin oziroma jih je bilo najmanj toliko zdravljenih v preteklem letu. To predstavlja vsaj 25 % vseh čebeljih družin v Sloveniji. Ta podatek je bil vodilo za določitev predvidene prevalence spornih uporabnikov, iz katerega so določili število vzorcev za pregled.
- Upoštevajoč načelo enakomerne razpršitve po celotnem območju Slovenije, prevalenco 25% in intervalom zaupanja 99% so s pomočjo programa WINEPI (<http://www.winepi.net/uk/sample/indice.htm>) izračunali, da je potrebno pregledati vsaj 17 čebeljih družin. Pri tej velikosti vzorca je možno z 99% gotovostjo trditi, da bo v vzorcu vsaj eden čebelar, ki je uporabljal ilegalno proizvedena zdravila (Drofenik, 2016).

Pregledali so 20 čebeljih družin pri 20 različnih čebelarjih. Pri vseh 20 čebelarjih so preiskali med, ki je bil namenjen prodaji končnemu potrošniku. Pri vseh 20 čebelarjih so pregledali tudi vosek, od tega pri enem čebelarju dva vzorca voska, ker je imel ta čebelar čebeljak na dveh lokacijah). V primeru,

da so pri analizi voska našli ostanke ilegalno proizvedenih zdravil, so pregledali tudi med iztočen iz satja (Drofenik, 2016).

1.3 Rezultati laboratorijskih analiz

Za analizo so na NLZOH uporabili naslednje metode (Znoj, 2016):

- za amitraz in njegove metabolite (2,4 dimetilnilin, 2,4 dimetilfenilformamid in N-2,4 dimetilfenil-N-etilformamidin) analizno metodo IM/GC-MSD/SOP 187,
- za klorfenvinfos analizno metodo IM/GC-MSD/SOP 104,
- za posamezne spojine iz skupine rotenoidov (rotenon, deguelin, tefrozin) analizno metodo SIST EN 15662 modif,
- za spojine etilbenzena, evgenola, m,p-ksilena, o-ksilena, naftalena, 1-metilnaftalena in 2-metilnaftalena analizno metodo IM/GC-MSD,
- za identifikacijo organskih spojin analizno metodo HS-SPME/GC-MS.

Meja določanja pomeni validirano najnižjo koncentracijo, ki jo je možno kvantificirati pri rutinskem spremljanju z validiranimi metodami; v tem kontekstu meja določanja predstavlja mejo kvantifikacije. Meja kvantifikacije je koncentracija, ki jo je možno določiti z zadostno gotovostjo v določenem matriksu (CTGB, 2014).

Mejno vrednost ostankov (MVO) zdravil za uporabo v veterinarski medicini v medu predpisuje Uredba komisije (ES) 37/2010 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora. MVO za amitraz, ki je legalna učinkovina za zatiranje varoj, znaša 0,2 mg/kg medu. Enako MVO za amitraz navaja tudi Evropska agencija za zdravila (EMA, 1999). Klorfenvinfos in rotenon nista dovoljeni zdravili za zatiranje varoj, zato Uredba 37/2010 MVO za klorfenvinfos in rotenon ne navaja, medtem ko so MVO za rotenon in klorfenvinfos v medu, matičnem mlečku, cvetnem prahu in satju z medom (0,01 mg/kg) predpisane v Uredbi Evropskega parlamenta in Sveta (ES) 396/2005/ES o mejnih vrednostih ostankov pesticidov v ali na hrani rastlinskega in živalskega izvora oziroma Uredbi Komisije (ES) 1138/2013 o spremembi prilog II, III in V k Uredbi Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 396/2005 glede najvišjih mejnih vrednosti ostankov za bitertanol, klorfenvinfos, dodin in vinklozolin v ali na nekaterih proizvodih.

V petih od dvajsetih vzorcev medu namenjenega za prodajo so ugotovili prisotnost amitraza nad mejo določanja, ki je 0,05 mg/kg. Koncentracije, so v analiziranih vzorcih medu znašale od 0,063 – 0,14 mg/kg (izraženo kot vsota amitraza in vseh metabolitov, ki vsebujejo skupino z 2,4-dimetil anilinsko strukturo). Vse ostale analizirane kemikalije v medu namenjenemu za prodajo so bile pod mejami določanja, ki so <0,01 mg/kg za deguelin, klorfenvinfos, rotenon in tefrozin ter <0,02 mg/kg za etilbenzen, evgenol, naftalen, 1-metilnaftalen, 2-metilnaftalen, m,p-ksilen in o-ksilen (Znoj, 2016). Rezultati so podrobno predstavljeni v Tabeli 1 Priloge 1.

V sedmih od dvajsetih vzorcev voska z imenom vzorca »satje z medom«, ki pa ni bil namenjen za prodajo, so ugotovili prisotnost amitraza v koncentracijah od 0,21 – 4,1 mg/kg (meja določanja <0,2 mg/kg) in v osmih vzorcih prisotnost klorfenvinfos v koncentracijah od 0,058 – 0,71 mg/kg (meja določanja <0,05 mg/kg). V dveh vzorcih so bili prisotni ostanki tako amitraza kot klorfenvinfos. Vse ostale analizirane kemikalije v vosku (satju) so bile pod mejami določanja, ki so <0,2 mg/kg za

deguelin, rotenon in tefrozin ter <0,02 mg/kg za etilbenzen, evgenol, naftalen, 1-metilnaftalen, 2-metilnaftalen, m,p-ksilen in o-ksilen (Znoj, 2016). Rezultati so podrobno predstavljeni v Tabeli 2 Priloge 1.

V vzorcih voska (satja), kjer je bila zaznana prisotnost aktivnih učinkovin nad mejo določanja, se je naknadno opravila tudi analiza medu iztočenega iz satja, kjer so v 6 vzorcih ugotovili ostanke amitraza v koncentracijah od 0,051 – 0,19 mg/kg, medtem ko so bile koncentracije klorfenvinifosa v vseh teh vzorcih manj kot 0,01 mg/kg. (Znoj, 2016). Rezultati so podrobno predstavljeni v Tabeli 3 Priloge 1.

1.4 Komunikacija rezultatov analiz

UVHVVR je ob objavi informacij o odkritju ostankov zdravil za uporabo v veterinarski medicini v medu in medu s satjem zagotovila, da uživanje medu ne predstavlja tveganja, in sicer na podlagi skladnosti z Uredbo 37/2010, ki predpisuje MVO za amitraz v medu: 0,2 mg/kg medu.

Istočasno je UVHVVR opozorila, da bi uživanje satja z medom lahko predstavljalo tveganje za zdravje (Bizjak, 2015). Naknadno je bilo obrazloženo, da vosek v vzorcih satja z medom ni bil namenjen za uživanje (Posedi, 2016).

V slovenski javnosti so se ob objavi rezultatov ostankov zdravil za uporabo v veterinarski medicini v medu in satju pojavile nasprotujoče si interpretacije v zvezi s tveganjem za zdravje, nekatere predvsem zaradi nezadostnega poznavanja procesa ocene tveganja in nerazumevanja definicij ter razlik med MVO in referenčnimi (varnimi) odmerki. Referenčni odmerki se določijo pri oceni nevarnosti, ki je nujni element ocene tveganja. Podatki o nevarnosti neke kemikalije ne pomenijo, da avtomatično obstaja tveganje za zdravje. Tveganje je verjetnost, da bo pri izpostavljenosti kemikaliji prišlo do škodljivega učinka. Ker je vsaka kemikalija pri dovolj velikem odmerku nevarna¹, je za identifikacijo in karakterizacijo nevarnosti potrebno narediti študije tako, da se ugotovi nevarnost in opredeli odnos med odmerkom in učinkom, ki je podlaga za določitev referenčnih (varnih) odmerkov. Referenčni odmerki so izhodišče za oceno tveganja. Tveganje je funkcija nevarnosti določene kemikalije in izpostavljenosti tej kemikaliji. Ocena tveganja se izvaja po mednarodno uveljavljeni metodologiji, kot je npr. opredeljeno v ECB-IHCP (2003), IPCS (2009) idr. Ocena tveganja kemikalij mora temeljiti na razpoložljivih znanstvenih dognanjih in se izvajati na neodvisen, objektiv in pregleden način. Za izdelavo ocen tveganja so pristojne neodvisne institucije, ki so strokovno usposobljene za izdelavo ocen tveganja na posameznih področjih.

V skladu z veljavno zakonodajo se oceni tveganje za zdravje zaradi ostankov pesticidov v živilih že v postopku registracije, torej preden se pripravki pojavijo na trgu, sicer pa v primerih, ko MVO niso določene.

K nesporazumom zaradi ostankov ilegalno proizvedenega zdravila za zatiranje varoj v medu in satju je prispevalo tudi sklicevanje na različne uredbe, ki predpisujejo MVO pesticidov v medu, matičnem mlečku, cvetnem prahu in satju z medom:

- Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) 396/2005 o mejnih vrednostih ostankov pesticidov v ali na hrani rastlinskega in živalskega izvora;

¹ Vse je strup. Nič ni, kar ni strup. Le odmerek loči strup od zdravila. (Timbrell, 2008)

-
- Uredba Komisije (ES) 149/2008 o spremembi Uredbe Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 396/2005 z uvedbo prilog II, III in IV, v katerih so določene mejne vrednosti ostankov pesticidov za živila, zajeta v Prilogi I k navedeni uredbi;
 - Uredba komisije (ES) 37/2010 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora;
 - Uredba Komisije (ES) 1138/2013 o spremembi prilog II, III in V k Uredbi Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 396/2005 glede najvišjih mejnih vrednosti ostankov za bitertanol, klorfenvinfos, dodin in vinklozolin v ali na nekaterih proizvodih.

Dodatno zaskrbljenost so povzročile neprecizno posredovane informacije o možnosti učinkov zaradi izpostavljenosti več snovem hkrati in zaradi možnosti škodljivega vpliva na delovanje hormonskega sistema, do katerega lahko v nekaterih primerih pride tudi pri izpostavljenosti odmerkom, ki so nižji od eksperimentalnih odmerkov brez učinka v toksikoloških študijah oziroma zelo nizkim odmerkom, ki smo jim dejansko izpostavljeni v vsakdanjem življenju.

Vsled velike zaskrbljenosti javnosti je UVHVVR pri Nacionalnem inštitut za javno zdravje (NIJZ) naročila izdelavo ocene tveganja, da bi se preverilo, ali uživanje medu, ki so ga proizvedli čebelarji ob uporabi nedovoljenega zdravila proizvajalca Apis M&D, lahko predstavlja tveganje za zdravje ljudi.

V skladu z Uredbo Evropske skupnosti 396/2005/ES o mejnih vrednostih ostankov pesticidov v ali na hrani rastlinskega in živalskega izvora je potrebno mejno vrednost ostankov (MVO) določiti na najnižji dosegljivi ravni, ki je skladna z dobro kmetijsko prakso, da bi tako zaščitili zdravje ljudi vključno z ranljivimi skupinami kot so npr. otroci ali nosečnice. MVO za pesticide v hrani zaradi zaščite potrošnikov v večini primerov temeljijo na ravni meje analitskega določanja in ne na ravni referenčnih (varnih) odmerkov, ki predstavljajo izhodiščno vrednost za oceno tveganja. Poleg tega se v državah članicah ES kot tudi pri Evropski agenciji za varno hrano (EFSA) redno spremljajo najnovejše informacije o toksikoloških značilnostih snovi in izvajajo ocene tveganja. V primeru, da se za določeno snov oziroma skupino snovi na podlagi novih izsledkov oceni, da bi ostanki kemikalij v živilih lahko predstavljali tveganje za zdravje, se predpišejo nižje vrednosti MVO. Če ob predlagani uporabi nižje vrednosti MVO ni možno doseči, se snov ne sme uporabljati na tej vrsti rastlin ali živali.

Predpisana MVO mora biti tako nizka, da niti ob izpostavljenosti isti snovi iz več živil hkrati, izpostavljenost ne sme biti tolikšna, da bi predstavljala tveganje za zdravje. Poleg tega je za večino snovi MVO bistveno nižja od referenčnih odmerkov za posamezno snov. To pomeni, da je previdnostni princip že vgrajen v zakonodajo.

Ker je bil ves analizirani med namenjen za prodajo skladen tako z Uredbo 37/2010 (amitraz) kot tudi z Uredbo 1138/2013 (klorfenvinfos) oz. Uredbo 396/2005 (rotenon), in ker živilo, ki je skladno z zakonodajo, ne predstavlja tveganja za zdravje, nadaljnja ocena tveganja sploh ne bi bila potrebna.

V upanju, da bomo pripomogli k razumevanju izvajanja ocen tveganja za kemikalije, ki je v prvi vrsti namenjeno zagotavljanju varne uporabe kemikalij, smo naredili oceno tveganja za amitraz v medu, za amitraz in klorfenvinfos v vosku (satju z medom) ter za zmes amitraza in klorfenvinfosa, čeprav satje z medom, v katerem so ugotovili amitraz in klorfenvinfos, ni bilo namenjeno za prodajo in zato do izpostavljenosti potrošnikov ne bi moglo priti.

K sodelovanju pri izdelavi rafinirane ocene tveganja za ostanke zdravil za uporabo v veterinarski medicini v medu in satju z medom smo povabili tudi eksperte, ki smo jih identificirali v procesu vzpostavljanja mreže ocenjevalcev tveganja (Perharič in Pollak, 2013), oziroma s katerimi že vrsto let učinkovito sodelujemo v sklopu Slovenskega toksikološkega društva.

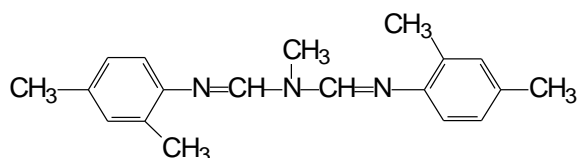
2 Ocena tveganja

2.1 Ocena nevarnosti

Nevarnost je inherentna danost kemikalije, da povzroči škodljivi učinek (strupenost). Ocena nevarnosti ima dva koraka: identifikacijo nevarnosti in karakterizacijo nevarnosti. Najprej se ugotovi vrsto in velikost škodljivega učinka v odvisnosti od načina stika oziroma poti vnosa v organizem ter odmerka, kar je podlaga za razvrstitev. Sledi opredelitev kritičnega odmerka ter odnosa med odmerkom in učinkom. Nevarnost je, poleg lastnosti kemikalije, njenega odmerka in poti vnosa v organizem oziroma načina stika odvisna tudi od genetske občutljivosti, starosti, spola, poklica, prehranskih navad, razvad in bolezenskih stanj izpostavljenega organizma. Na podlagi rezultatov laboratorijskih poskusov v razmerah *in vivo* ter *in vitro*, izsledkov kliničnih primerov in epidemioloških študij, v zadnjem času pa tudi *in silico* podatkov se ob upoštevanju vseh znanih podatkov in faktorjev ocenjevanja določi referenčne odmerke, to je odmerke, ki nimajo škodljivih učinkov na zdravje. Velikost faktorjev ocenjevanja odseva raven negotovosti zaradi vrzeli v poznavanju razlik v toksikodinamiki in toksikokinetiki med poskusnimi živalmi in ljudmi ter razlik v toksikodinamiki in toksikokinetiki med posameznimi ljudmi, kot tudi vrzeli v zvezi s količino in kvaliteto študij. Faktorji ocenjevanja so se v preteklosti imenovali varnostni faktorji oz. faktorji negotovosti in predstavljajo pomembno varovalko pri določanju referenčnih odmerkov. Referenčni odmerki so izhodišče za oceno tveganja.

2.1.1 Amitraz

2.1.1.1 Fizikalno kemijske lastnosti



Amitraz (CAS št.: 33089-61-1) je formamidinski insekticid in akaricid s kemijskim imenom *N'*-(2,4-dimetilfenil)-*N*-[[[(2,4-dimetilfenil) imino] metil]-*N*-metilmetaniminamid, molekulsko maso 293,4 g/mol in kemijsko formulo $C_{19}H_{23}N_3$. V vodi je slabo topen, dobro se topi v organskih topilih. Disociacijska konstanta (pK_a) znaša 4.2 ± 0.1 pri 20°C . Pri nevtralnem pH ima v vodnih raztopinah razpolovni čas 22 ur, medtem ko razpade hitreje v kislem in počasneje v bazičnem mediju. Pri fiziološki vrednosti pH in temperaturi 28°C ima na svetlobi razpolovni čas 46.5 ur. Porazdelitveni koeficient ($\log K_{ow}$) amitraza je odvisen temperature in vrednosti pH ter se giblje od 5.6 pri vrednosti pH 9 in temperaturi 40°C do 6.01 pri vrednosti pH 5.25 in temperaturi 22°C (EFSA, 2003).

2.1.1.2. Mehanizem delovanja

Amitraz je agonist adrenergičnih receptorjev α_1 (ED_{50} 10 nM) in α_2 (ED_{50} 130 nM), antagonist H1 (IC_{50} 10 μ M); v višjih koncentracijah pa inhibira tudi encima prostaglandin (PG)-sintetazo in monoamin-oksidozo (MAO). Zaradi inhibicije obeh izooblik MAO-A in MAO-B pride do upočasnjene razgradnje in povečane koncentracije noradrenalina (NA), dopamina (DA), 5-hidroksitriptamina (5-HT), ter posledične aktivacije adrenergičnih receptorjev, inhibicije PG-sintetaze in spremenjene koncentracije spolnih hormonov (del Pino et al, 2015).

Prevladujoč učinek amitraza poteka prek aktivacije adrenergičnih receptorjev α_2 . To se odraža v padcu simpatičnega tonusa (manjši aktivnosti simpatika), kar vodi do manjše frekvence bitja srca, padca krvnega tlaka, spremenjenega obnašanja, spremenjenega premera zenice, hipotermije, epileptičnih krčev, poliurije, slabše gibljivosti prebavil in zaprtja ter hiperglikemije.

2.1.1.3 Absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje pri sesalcih

Amitraz se obsežno absorbira po peroralni aplikaciji (>80%), in sicer se iz prebavil v 24 urah absorbira 80% amitraza. V tkivih se enakomerno porazdeli; največje koncentracije so našli v ščitnici, nadledvičnih žlezah, jetrih in očeh. V organizmih se ne kopiči in se hitro izloči z urinom, od tega približno 50% v 24 urah, 80% v 72 urah in 94% v 96 urah (EFSA, 2003).

Amitraz se v jetrih obsežno metabolizira do številnih metabolitov, ki se izločijo iz organizma z urinom. Shema metabolnih poti je prikazana na Sliki 1 Priloge 1. Metabolizem amitraza poteka večinoma s hidrolizo do N-(2,4-dimetilfenil)-N'-metil formamidina, ki je biološko aktiven metabolit in se že lahko izloči z urinom ter do 2,4-dimetilformamidina. Količina formamidinskega metabolita je odvisna od odmerka in znaša pri nizkih odmerkih manj kot 5% ter pri visokih odmerkih vse do 38% (JMPR, 1998). Oba metabolita še vedno vsebujeta 2,4-dimetilanilinsko strukturo. Za spojine z dimetilanilinsko strukturo je značilno, da lahko delujejo genotoksično. Kar se ga ne izloči, se formamidinski derivat metabolizira naprej do derivata benzojske kisline, ki se konjugira z acetilno skupino in nastali konjugat se izloči iz organizma z urinom. Omenjeni metabolit derivat benzojske kisline in njegov konjugat tudi prevladujeta v urinu (približno 70%) (JMPR, 1998).

Za amitraz je bilo dokazano in vitro in in vivo na podganah, da je induktor številnih jetrnih CYP P450 encimov (CYP1A/2, CYP2B1/2B2 in 3A) (Ueng in sod., 2004). Indukcija omenjenih encimov lahko vpliva na metabolizem številnih endogenih in eksogenih spojin kot so glukokortikoidi, spolni hormoni in zdravilne učinkovine, ki se metabolizirajo z navedenimi encimi (Flockhart, 2007).

2.1.1.4 Strupenost

Pri navajanju podatkov o strupenosti najprej navajamo izsledke študij, ki so bile narejene v skladu z dobro laboratorijsko prakso (DLP) in v skladu s testnimi smernicami predpisanimi v postopku ocenjevanja amitraza pri Evropski agenciji za varno hrano (EFSA, 2003). Navajamo pa tudi izsledke

drugih študij, ki smo jih našli v strokovni literaturi, vendar vse študije niso bile izvedene v skladu z DLP in predpisanimi tesnimi smernicami.

2.1.1.4.1 Lokalni učinki

Amitraz ni dražilen za kožo in sluznice. Pri stiku s kožo lahko povzroča senzitizacijo in alergične reakcije (EFSA, 2003).

2.1.1.4.2 Akutna strupenost

Smrtni odmerek za 50% poskusnih živali (LD₅₀) znaša pri zaužitju 600 mg/kg telesne mase (tm). LD₅₀ pri dermalnem vnosu znaša > 1600 mg/kg tm, pri vdihavanju aerosola v trajanju 6 ur pa 65 mg/l zraka (EFSA, 2003).

Pri zdravih prostovoljcih so ugotovili zmanjšano budnost pri 0,25 mg/kg tm/dan. Akutni NOAEL² za nevrotoksičnost pri človeku znaša 0,125 mg/kg tm/dan (EFSA, 2003).

Avsarogullari et al. (2006) poročajo o znakih zastrupitev pri 23 odraslih, ki so se z amitrazom zastrupili po nesreči oziroma namerno, v večini po zaužitju pripravka, ki je vseboval 12,5% amitraza v ksilenu. Odmerkov ni bilo možno natančno opredeliti. Po anamnestičnih podatkih so znašali od 15-100 mL, mediana 25 mL. V 5-30 minutah po izpostavljenosti sta se pojavila siljenje na bruhanje in bruhanje, medtem ko so se ostali simptomi (motnje zavesti, zaspanost, utrujenost in težave z govorom, padec arterijskega krvnega pritiska, upočasnjena frekvenca srčnega utripa, zožene oz. razširjene zenice) pojavili v 30-120 minutah po izpostavljenosti. S preiskavami so ugotovili porast serumskega sladkorja in jetrnih encimov. Osem bolnikov so obravnavali v urgentni enoti. Trinajst je bilo sprejetih v enoto za intenzivno terapijo, od teh je eden tri dni po sprejemu umrl zaradi pljučne tromboembolije. Ključne pomanjkljivosti študije so slabo opredeljeni odmerki in možnost, da bi bili nekateri od ugotovljenih učinkov (motnje zavesti in porast jetrnih encimov) lahko tudi posledica sočasne izpostavljenosti ksilenu (topilo v pripravku).

2.1.1.4.3 Genotoksičnost

Študije genotoksičnosti amitraza s serijo standardnih osnovnih testov genotoksičnosti so pokazale, da ni mutagen za bakterije, sesalčje celice *in vitro* in *in vivo* v testu dominantne letalnosti na miših ter ni povzročil kromosomskih poškodb *in vitro* (USEPA 1996; JMPR 1998). Njegov metabolit 2,4-dimetilanilin je v prisotnosti metabolične aktivacije povzročil mutacije v testnem sistemu s celicami mišjega limfoma *in vitro*, medtem ko *in vivo* ni povzročil tvorbe mikrojedrov v kostnem mozgu izpostavljenih miših (JMPR 1998). Te rezultate je upoštevala EFSA pri postopku vključevanja amitraza na seznam dovoljenih aktivnih snovi v sredstvih za zaščito rastlin v ES in ocenila, da lahko smatra, da amitraz ni genotoksičen (EFSA, 2003).

² NOAEL – Odmerek, pri katerem v eksperimentalnih študijah ni bilo ugotovljenega škodljivega učinka.

V dveh nedavnih raziskavah so s testom komet ugotovili da amitraz povzroča poškodbe DNK pri celicah kitajskega hrčka (CHO) (Padula in sod., 2012) in pri izoliranih človeških limfocitih *in vitro* (Radakovic in sod, 2013). V obeh raziskavah so poškodbe DNK zaznali pri koncentracijah, ki so povzročile tudi apoptozo, zato je zelo verjetno, da so poškodbe DNK posledica procesov razgradnje DNK v procesu odmiranja celic in ne neposredne interakcije amitraza z DNK. Poleg tega so Radakovič in sod (2013) pokazali, da se s podaljševanjem izpostavljenosti obseg poškodb DNK zmanjšuje ter da prisotnost antioksidanta katalaze signifikantno zmanjša nastanek z amitrazom povzročenih poškodb DNK in apoptozo, kar kaže, da so za citotoksičnost in nastanek poškodb DNK odgovorne proste kisikove zvrsti, ki verjetno nastanejo pri presnovi amitraza. To kaže, da je mehanizem morebitnega genotoksičnega delovanja amitraza posreden, za katerega obstaja prag delovanja.

2.1.1.4.4 Kronična strupenost

2.1.1.4.4.1 Učinki pri študijah ponavljajoče se izpostavljenosti in študijah rakotvornosti

V 90 dnevni in dvoletni študiji pri psih so ugotovili zmanjšanje telesne mase, škodljive učinke na jetra in na vedenje. V obeh študijah je znašal NOAEL 0,25 mg/kg tm/dan (EFSA, 2003).

V študijah rakotvornosti so ugotovili povečan nastanek adenomov in karcinomov jeter in adenomov pljuč pri samicah miši B₆C₃F₁ in tumorje limfnega tkiva pri samicah miši CFLP, medtem, ko pri podganah amitraz ni povzročil povečane pogostnosti tumorjev. Povečano pogostnost tumorjev so zaznali le pri najvišjem danem odmerku 60 mg/kg tm/dan, pri katerem je bilo opaženo tudi signifikantno zmanjšanje telesne mase (NOAEL za sitemsko toksičnost 3,75 mg/kg tm/dan). Povečano pogostnost adenomov in karcinomov so ugotovili v jetrih in pljučih, ki so najpogostejše mesto nastanka spontanah tumorjev (JMPR, 1998). Zato rezultati teh raziskav niso relevantni za sklepanje o rakotvornosti amitraza za ljudi. USEPA (2006) je pri oceni rakotvornosti amitraza ocenila, da njegove rakotvornosti ni mogoče povsem izključiti, vendar pa so mejne vrednosti določene na osnovi drugih toksikoloških podatkov dovolj nizke, da zagotavljajo varnost glede vseh neželenih učinkov ne glede na trajanje izpostavljenosti (USEPA, 2006). Ta zaključek podpirajo tudi novejša raziskave, ki kažejo na mehanizem posrednega genotoksičnega delovanja (glej 2.1.1.4.3 Genotoksičnost).

2.1.1.4.4.2 Učinki na endokrini (hormonski) sistem

Vpliv amitraza na endokrino funkcijo je posreden; potrebna je aktivacija adrenergičnih receptorjev α_2 . Prek aktivacije receptorjev α_2 pride tudi do motenj endokrinega sistema; npr. zmanjša se sproščanje gonadoliberina (GnRH) in luteinizirajočega hormona (LH) pri podganah (Goldman in Cooper, 1993). Pri podganah se zmanjša tudi produkcija progesterona, ne pa estrogena. Ta učinek pri podganah povzroča odmerki 50 mg/kg tm/dan (Safe in Wormke, 2003). Amitraz v odmerku 1,85 mg/kg tm (apliciran lokalno) zmanjša sproščanje inzulina in poveča koncentracijo glukoze v krvi pri psih ter podganah (Smith in sod., 1990). Tudi ta učinek posredujejo adrenoceptorji α_2 . Večkratno odmerjanje velikih odmerkov (50 mg/kg tm/dan) amitraza pri podganah inducira aktivnost citokromov CYP 1A, 2B in 3A ter poveča sintezo testosterona pri podganah moškega spola ter metabolizem estrogena in testosterona pri podganah obeh spolov, kar lahko vpliva na koncentracijo spolnih hormonov v serumu (Safe in Wormke, 2003). Mehanizmi, preko katerih amitraz lahko deluje na

endokrini sistem vključujejo delovanje na monoaminski sistem, in neposredno delovanje na endokrine žleze.

2.1.1.4.4.3 Učinki na imunski sistem

Zaradi vpliva na produkcijo prostaglandina E2 in antagonizma histaminskih receptorjev H1, amitraz deluje protivnetno. Preko imunskih celic lahko deluje imunotoksično in lahko povzroča kontaktno preobčutljivost, ki nastopi s časovnim zamikom. LOEL³ znaša 26,5 mg/kg tm/dan (Institoris in sod., 2007), vendar podatkov, če so bile študije opravljene po smernicah, ni.

2.1.1.4.4.4 Učinki na živčni sistem

Majhni odmerki amitraza (6,25 – 25 mg/kg tm/dan) zmanjšajo motorično aktivnost pri podganah (Moser et al., 1987). Večji odmerki amitraza (50 – 100 mg/kg tm/dan) pa povzročijo zmanjšanje telesne teže in telesne temperature ter povečajo agresivnost in pojav epileptičnih krčev pri podganah (Gilbert, 1988).

2.1.1.4.5 Učinki na razmnoževanje in potomstvo

EFSA (2003) poroča škodljivih učinkih na dojenje in zmanjšano skrb za potomstvo. Teratogeni potencial ni bil ugotovljen, škodljive učinke na zarodke so ugotovili pri odmerkih, ki so bili škodljivi tudi za matere. Najnižji NOAEL za razmnoževanje je pri podganah znašal 1,3 mg/kg tm/dan za razvojno strupenost pa 6 mg/kg tm/dan pri kuncih.

Spremenjeno hormonsko, monoaminsko in prostaglandinsko ravnovesje, ki ga povzroči amitraz, se odrazi v vplivu na spolno vedenje in dolžini spolnih faz pri glodavcih. Pri podganah se podaljša estrus, poveča se število mrtvorojenih mladičev. Pri miših pa amitraz povzroči podaljšanje proestrusa in skrajšanje diestrusa ter slabši apetit, ki ima za posledico zmanjšanje telesne mase. Ugotovili so, da so miši bolj občutljive na amitraz kot podgane (del Pino in sod., 2015). V zadnjih dveh opravljenih raziskavah reprotoksičnosti pri podganah in miših, so podganjim samcem dajali amitraz v odmerkih po 0, 1,5, 4,5 in 13 mg/kg tm/dan začenši dva tedna pred parjenjem ter do konca dvotedenskega obdobja paritve. Podganjim samicam pa so dajali enake odmerke od 2 tednov pred paritvijo do četrtega dne po kotitvi. Podgane, ki so uživale 13 mg amitraza/kg tm/dan so postale manj ješče, povečala se je smrtnost brejih samic. Pri samcih so opazili zmanjšanje semenske žleze, manj mobilne spermije; pri samicah se je zmanjšalo število živorojenih mladičev, povečalo se je število spontanih splavov. NOAEL za splošno strupenost za razmnoževanje in razvojno strupenost znaša 4,5 mg/kg/dan (Lim et al., 2010).

V literaturi smo našli še eno študijo razvojne toksičnosti napravljeno po smernicah, ki je pokazala, da amitraz povzroči okvare pri brejih samicah in zarodkih v odmerku 30 mg/kg/dan. Pojavilo se je: manjše število ob rojstvu živih mladičev in povečano število spontanih splavov, kar nakazuje na toksično delovanje amitraza v embrio-fetalnem razvoju. Ločnice ali je teratogeno delovanje posledica

³ LOEL-Najnižji odmerek, pri katerem je v bil v eksperimentalnih študijah ugotovljen učinek.

delovanja amitraza neposredno na plod ali posledica toksičnega delovanja na brejo samico se na podlagi te študije ni dalo potegniti. Vzroki za strupenost pri brejih samicah in zarodkih so lahko posledica oksidativnega stresa, porušenega hormonskega ravnovesja in ravnovesja monoaminskih prenašalcev v živčevju. V tej študiji je bil določen NOAEL 3 mg/kg tm/dan tako za matere kot za razvoj zarodkov (Kim et al, 2007).

Del Pino et al. (2011) poročajo o rezultatih opravljenih študij na razvoj osrednjega živčevja, ki so pokazali, da izpostavljenost brejih samic povzroči dolgotrajne spremembe v noradrenergičnega, serotonorgičnega in dopaminergičnega sistema v prefrontalnem korteksu, striatumu in hipokampusu. Nevrokemične spremembe, ki nastanejo zaradi inhibicije MAO in drugačne koncentracije spolnih hormonov, se lahko odražajo v strukturnih in funkcijskih spremembah. NOAEL ni bil določen.

2.1.1.4.6 Strupenost metabolita N-2,4-dimetilfenil-N-metilformamidina

LD50 po vnosu per os znaša približno 200 mg/kg tm. Genotoksični potencial ni bil ugotovljen. V 90 dnevni študiji pri psu je znašal NOAEL 0,1 mg/kg tm/dan (EFSA, 2003). Delež tega metabolita znaša od 3-38% in je odvisen od odmerka (JMPR, 1998).

2.1.1.4.7 Razvrstitev

V skladu z Uredbo 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi in zmesi je amitraz razvrščen kot:

- Preobčutljivost v stiku s kožo kategorije 1; H317 - Lahko povzroči alergijo pri stiku s kožo;
- Akutno strupen kategorije 4; H302 - Zdravju škodljiv pri zaužitju.
- **Specifično strupen za ciljne organe pri ponavljajoči se izpostavljenosti;**
H373 - Lahko škoduje organom pri dolgotrajnem ali ponavljajočem se uživanju.

2.1.1.4.8 Kritični odmerek in referenčni (varni) odmerki

Ob upoštevanju izsledkov študij v točkah 2.1.1.4.2 - 2.1.1.4.6 menimo, da je najnižji akutni NOAEL 0,125 mg/kg tm/dan (nevrotoksičnost pri človeku). Ob upoštevanju faktorja ocenjevanja 10 zaradi razlik v toksikodinamiki in toksikokinetiki predlagamo akutni referenčni odmerek (ARfD)⁴ za amitraz 0,01 mg/kg tm/dan.

Po mnenju EFSA (2003) je zanesljivejši kritični NOAEL 0,25 mg/kg tm/dan (90 dnevna študija pri psih). Nekateri eksperti pri EFSA so namreč menili, da študija na prostovoljcih ni dovolj zanesljiva, medtem ko so drugi menili, da smernice v zvezi z uporabo rezultatov študij na prostovoljcih niso dovolj jasne. Vendar so se strinjali, da zaradi podatkov o akutnem NOAEL pri prostovoljcih zadostuje faktor ocenjevanja 25 in določili za amitraz ARfD 0,01 mg/kg tm/dan.

⁴ ARfD - Akutni referenčni odmerek je odmerek, ki smo mu lahko izpostavljeni enkratno oz. v krajšem časovnem obdobju (do 14 dni) in ki na podlagi vseh znanih podatkov ne predstavlja tveganja za zdravje.

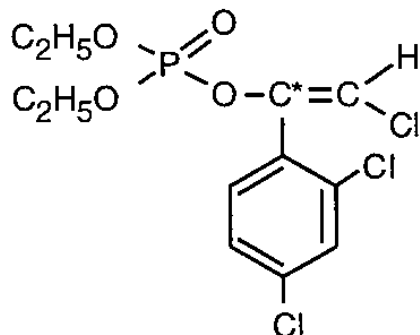
Po predlogu EFSA (2003) znaša sprejemljivi dnevni vnos (ADI)⁵ za vseživljenjsko izpostavljenost 0,003 mg/kg tm/dan in temelji na NOAEL 0,25 mg/kg tm/dan (dvoletna študija pri psih) ob upoštevanju faktorja ocenjevanja 100, 10 zaradi razlik v toksikodinamiki in toksikokinetiki med poskusnimi živalmi in ljudmi ter 10 zaradi razlik v toksikodinamiki in toksikokinetiki med posameznimi ljudmi.

*Odmerki brez ugotovljenega učinka (NOAEL), ki so bili podlaga za določitev referenčnih vrednosti za amitraz so manjši od odmerkov, pri katerih so ugotovili učinke na endokrini sistem (1,85 mg/kg tm/dan – glej točko 2.1.1.4.4.2), kot tudi od NOAEL za razmnoževanje in potomstvo (1,3 oziroma 6 mg/kg tm/dan – glej točko 2.1.1.4.5). Zato lahko na podlagi preučenihih podatkov zaključimo, da so trenutno veljavni referenčni odmerki dovolj nizki tudi v zvezi z morebitnim motenjem hormonskega ravnovesja ter vplivi na razmnoževanje in potomstvo z izjemo nedavno **opravljenih študij na razvoj osrednjega živčevja, pri katerih NOAEL ni bil določen.***

⁵ ADI – Sprejemljivi dnevni vnos je odmerek, ki smo mu lahko izpostavljeni vse življenje in ki na podlagi vseh znanih podatkov ne predstavlja tveganja za zdravje.

2.1.2 Klorfenvinfos

2.1.2.1 Fizikalno kemijske lastnosti



Klorfenvinfos (CAS št. 470-90-6) s kemijskim imenom 2-kloro-1-(2,4-diklorofenil)vinil dietil fosfat, z molekulsko maso 359,57 g/mol in kemijsko formulo $C_{12}H_{14}Cl_3O_4$ je organofosfatni insekticid, ki v ES ni odobren za kmetijsko uporabo, niti ni dovoljen kot veterinarsko zdravilo za zatiranje varoj.

Zaradi kemijske zgradbe je lipofilen, kar pomeni, da se dobro topi v organskih topilih (acetone, etanol, kerozin, ksilen, propilen, glikol, diklorometan, heksan) in to potrjuje tudi njegov porazdelitveni koeficient oktanol/voda (log Kow 3,81). V vodi je zelo slabo topen. V enem litru vode se raztopi 124 mg klorfenvinfos (HSDB, 2003).

Slaba topnost klorfenvinfos v vodi je najverjetneje razlog, da ga niso dokazali v medu, ker med ne vsebuje snovi, ki bi spodbujale prehajanje klorfenvinfos v med.

V poročilu EFSA o poginih čebel so sicer poročali, da so klorfenvinfos našli v medu v letih 2003 (4 vzorci) in 2004 (7 vzorcev) tekom izvajanja rednega državnega monitoringa. Izmerjena koncentracija klorfenvinfos v medu ni podana. Prav tako so o prisotnosti klorfenvinfos poročali v Grčiji, kjer so ga našli v vzorcih medu čebel, ki so se pasle na kmetijskem področju, kjer so intenzivno gojili citruse (4/19 vzorcev) in bombaž (1/17 vzorcev). V medu so izmerili koncentracije klorfenvinfos od 0,00015 do 0,00020 mg/kg (Balayiannis in Balayiannis, 2008). Glede na to, da so vzorčenja medu potekala na področjih intenzivnega gojenja kultur, ki so bile škropljene s takrat še odobrenim klorfenvinfosom, je bila koncentracija v medu res nizka. Tudi o kopičenju klorfenvinfos v vosku poročajo v literaturi (Boi in sod., 2015).

2.1.2.2 Mehanizem delovanja

Klorfenvinfos sodi med organofosfatne insekticide in je inhibitor encima acetilholinesteraze (AChE). Acetilholinesteraza je encim, ki razgrajuje živčni prenašalec acetilholin. Acetilholin sodeluje pri prenašanju živčnih signalov in se sprošča iz nevronov oz. živčnih celic. Nevroni so povezani z drugimi nevroni in ostalimi efektorskimi celicami (npr. mišičnimi celicami). Stiki med njimi se imenujejo sinapse. Sinapso sestavljata presinaptični končič živčne celice (aksona) in postsinaptična struktura na drugem nevronu ali pa postsinaptična membrana mišične oz. katere druge efektorske celice. Ena postsinaptična struktura ima običajno stik z več presinaptičnimi končiči in vice-versa.

Osnova delovanja živčnega sistema je prevajanje elektro-kemičnih potencialov, ki jih imenujemo tudi akcijski potenciali iz periferije proti možganom ali od možganov proti periferiji. Prenos živčnega signala, pri katerem kot živčni prenašalec sodeluje acetilholin, poteka v normalnih razmerah tako, da akcijski potencial sproži odprtje kalcijevih kanalčkov v presinaptičnem končiču in s tem povišanje koncentracije kalcijevih ionov v končiču. V odziv na dvig koncentracije kalcija se začne sproščati acetilholin v sinaptično špranjo. Acetilholin se veže na receptorje v postsinaptični membrani in sproži odprtje kanalčkov za prenos natrijevih ionov v efektorsko celico, če se veže na nikotinski receptor. Po aktivaciji receptorja, se sprostí z vezavnega mesta, se potem razgradi v zunajceličnem prostoru z encimom acetilholinesterazo. Z disociacijo z receptorja in posledično encimsko razgradnjo se prekine prenos živčnega signala (ATSDR, 1997).

Poleg nikotinskih receptorjev, se acetilholin veže lahko še na muskarinske receptorje, ki pa niso vključeni v hitri sinaptični prenos. V osrednjem živčevju delujejo predvsem modulatorno, v drugih tarčnih celicah pa acetilholin preko vezave na muskarinski receptor povzroča kontrakcijo gladkih mišic (dihala, prebavila, sečila), izločanje sluzi (dihala), želodčne kisline in zmanjša frekvenco srčnega utripa. Tudi v teh tarčnih tkivih acetilholin razgradi acetilholinesteraza in s tem zmanjša razpoložljivost živčnega prenašalca.

Klorfenvinfos se veže na encim AChE in tako onemogoči razgradnjo acetilholina, posledica česar je kopičenje acetilholina v sinaptičnih špranjah in ob tarčnih celicah, kar vodi do nepretrgane in pretirane stimulacije holinergičnih receptorjev. Prekomerna stimulacija muskarinskih receptorjev povzroča bronhokonstrikcijo, povečano izločanje sluzi iz bronhijev, povečano slinjenje, soljenje in potenje, siljenje na bruhanje, bruhanje, trebušne krče, drisko in upočasnen srčni utrip, ki lahko vodi do srčnega zastoja. Acetilholin se veže tudi na nikotinske receptorje, na avtonomnih ganglijah in živčno-mišičnih stikih in v osrednjem živčevju. Kopičenje acetilholina ob nikotinskih receptorjih sproži kontinuirano in pretirano stimulacijo skeletnih mišičnih vlaken, trzanje, fascikulacijo, krče in paralizo mišic. Delovanje acetilholina na avtonomne ganglije povzroča povišan arterijski krvni pritisk. Paraliza dihalnih mišic lahko povzroči prenehanje dihanja in smrt. V primeru, da se acetilholin ne razgradi v sinaptičnih špranjah osrednjega živčnega sistema povzroča prehodno aktivacijo osrednjega živčevja (napetost, občutek tesnobe, nemir, nespečnost, glavobol, čustveno nestabilnost, nevroze, pretirano sanjanje in nočne more), sledijo apatija, zaspanost, zmedenost, tresavica, ataksija, epileptični krči, depresija dihanja in koma. Najpogostejši vzrok smrti zaradi zastrupitve z organofosfati je prenehanje dihanja (ATSDR, 1997).

V študiji na podganah so ugotovili tudi, da klorfenvinfos vpliva na ravnovesje med nastalim in porabljenim noradrenalinom in tako povzroči spremembo krvnega pritiska, ki se pojavi pri zastrupitvi s tem organofosfatom (ATSDR, 1997).

2.1.2.3 Absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje pri sesalcih

Klorfenvinfos se po peroralnem vnosu obsežno absorbira in hitro izloči predvsem z urinom. Pri podganah se je v 24 urah 52 % testne snovi izločilo z urinom pri samcih in 77 % pri samicah. V naslednjih 124 urah se je izločilo pri samcih še 6 % z urinom, pri samicah pa 25 %. Z blatom se je v

96 urah izločilo 11,2 % klorfenvinfos, z izdihanim zrakom pa 1,4 %. V 96 urah se je ves peroralno prejet klorfenvinfos izločil iz organizma podgan.

Psi, ki so peroralno prejeli klorfenvinfos, so z urinom izločili 86 % testne snovi in z blatom 4 % v 24 urah.

Pri odraslem moškem, ki je zaužil radioaktivno označen klorfenvinfos so izmerili, da se je 72 % tega izločilo z urinom v 4 urah in pol, v 24 urah pa 94 %. Rezultati študij na poskusnih živalih in ljudeh kažejo, da se klorfenvinfos hitro absorbira in izloči in organizma.

Pri podganah in psih, ki so peroralno prejeli klorfenvinfos v urinu niso našli izhodne spojine, ampak samo njegove metabolite, kar kaže, da se je pri poskusnih živalih absorbiran klorfenvinfos popolnoma presnovil. V urinu človeka, ki je zaužil klorfenvinfos so našli pet metabolitov te aktivne snovi.

Detoksifikacija klorfenvinfos poteka predvsem z oksidativnim de-etiliranjem v fosfodiester, pri čemer imajo pomembno vlogo mikrosomalni encimi (JMPR, 1994).

Shema metabolnih poti klorfenvinfos je prikazana na Sliki 2 Priloge 1.

2.1.2.3.1 Interakcije z drugimi kemikalijami

Snovi z inhibitornim potencialom za AChE, kot npr. drugi organofosfatni in karbamatni insekticidi lahko povečajo strupenost klorfenvinfos. Trajanje učinkov klorfenvinfos je pretežno odvisno od hitrosti njegovega metabolizma (oksidativno dealkiranje). Snovi, ki inducirajo encimski sistem CYP P450, lahko zaradi indukcije metabolnih encimov pospešijo presnovo klorfenvinfos in tako zmanjšajo njegovo strupenost. Snovi, ki zavrejo presnovne encime podaljšajo razpolovni čas klorfenvinfos in posledično lahko povečajo njegovo strupenost (JMPR, 1994; ATSDR, 1997).

Na seznamu snovi, ki inducirajo encimski sistem CYP P450 so številna zdravila (npr. acetil salicilna kislina, morfin, fenitoin, karbamazepin, omeprazol, inzulin, steroidni hormoni), psihotropne spojine (amfetamin, etanol, nikotin), živila (brokoli, brstični ohrovt, na oglju pečeno meso). Med zaviralci CYP P450 so zdravilne učinkovine (npr. amiodaron, ciprofloksacin, fluoksatin, flukonazol, klopidrogel, paroksetin), kokain in druge kemikalije, kot so ogljikov monoksid, ogljikov tetraklorid, vinilklorid (ATSDR, 1997; Flockhart, 2007).

2.1.2.4 Strupenost

2.1.2.4.1 Lokalni učinki

V študijah na poskusnih živalih je klorfenvinfos rahlo dražil kožo in oči. Po stiku s kožo ni povzročil preobčutljivosti (JMPR, 1994).

2.1.2.4.2 Akutna strupenost

S klorfenvinfosom so bile izvedene številne študije po oralnem in dermalnem vnosu, ter ena po vdihavanju. Pregled rezultatov študij akutne toksičnosti klorfenvinfosoma pri poskusnih živalih je v tabeli 5 priloge 1.

Rezultati študij akutne oralne toksičnosti kažejo na veliko razliko v občutljivosti vrst poskusnih živali, kar je verjetno posledica razlik v metabolizmu (ATSDR, 1997).

V eni od študij so podgane s krmo 10 dni zapored prejemale klorfenvinfos. V študiji je bil uporabljen le en odmerek testne snovi (2,4 mg/kg tm/dan). Opazili so, da so podgane, ki so uživale klorfenvinfos imele za 52 % znižano aktivnost plazemske AChE in 30 % znižano aktivnost eritrocitne AChE v primerjavi s kontrolno skupino. Poleg tega so pri živalih opazili tudi znižano absorpcijo glukoze, za katero so strokovnjaki menili, da ni statistično značilna. V študiji niso določili NOAEL, bil je določen le najnižji odmerek s škodljivim učinkom (LOAEL⁶), 2,4 mg/kg tm/dan (Barna in Simon, 1973).

V akutni študiji so pri samcih podgan Wistar po enkratni izpostavitvi klorfenvinfosu (6,15 mg/kg tm) izmerili statistično značilno višje vrednosti kortikosterona v plazmi (300 % povišanje) po eni in treh urah po vnosu klorfenvinfosoma (Osicka-Koprowska et al. 1984). V isti študiji so v času od ene do šest ur po vnosu klorfenvinfosoma pri podganah opazili tudi statistično značilno povišanje aldosterona v plazmi. V študiji so zaključili, da toksikološki pomen teh sprememb ni poznan.

Pri prostovoljcih enkratni odmerek 1 mg/kg tm/dan ni povzročil nobenih nenormalnih kliničnih zakov, medtem ko je bila aktivnost plazemske in eritrocitne AChE znižana.

Enajstim prostovoljcem so na kožo podlakti nanесли 5-10 mg klorfenvinfosoma/kg tm v obliki različnih vrst fitofarmaceutskih sredstev (80 % in 24 % koncentrat za emulzijo in 25 % močljivi prašek v vodi) za obdobje do štirih ur. V krvi prostovoljcev so določili prisotnost klorfenvinfosoma, a le pri izpostavljenosti 24 % koncentratu za emulzijo so ugotovili znižano aktivnost AChE (JMPR, 1971).

Meritve aktivnosti AChE so opravili pri delavcih v Indiji, ki so 6 dni zapored škropili riževa polja s klorfenvinfosom, brez uporabe zaščitne opreme. Pri delavcih, ki so uporabljali koncentrat za emulzijo so opazili znižanje aktivnosti plazemske AChE, ne pa tudi eritrocitne AChE. Delavci, ki so uporabljali sredstva za zaščito rastlin z 10 % klorfenvinfosoma v obliki granul, so imeli nespremenjeno aktivnost AChE (JMPR, 1971).

2.1.2.4.3 Genotoksičnost

Več študij povratnih mutacij (Amesov test) je bilo opravljenih s klorfenvinfosom na bakterijskih celicah. Rezultati večine študij so negativni, tako v prisotnosti kot odsotnosti metabolnega sistema S9. Le v eni študiji so v prisotnosti S9 opazili povečano pojavljanje povratnih mutacij pri sevu *Salmonella typhimurium* TA100 v prisotnosti in odsotnosti S9. Klorfenvinfos ni povzročil kromosomskih aberacij

⁶ LOAEL-Najnižji odmerek, pri katerem je v bil v eksperimentalnih študijah ugotovljen škodljivi učinek.

in vitro v človeških limfocitih, in tudi ne *in vivo* v kostnem mozgu kitajskih hrčkov. Prav tako je bil tudi rezultat študije dominantnih letalnih mutacij s klorfenvinfosom negativen (JMPR, 1994).

2.1.2.4.4 Kronična strupenost

2.1.2.4.4.1 Učinki pri študijah ponavljajoče se izpostavljenosti in študijah rakotvornosti

S klorfenvinfosom sta bili izvedeni študiji kronične toksičnosti in rakotvornosti na miših in podganah. Pri obeh vrstah so opazili znižanje aktivnosti plazemske, eritrocitne in možganske AChE po uživanju klorfenvinfosa v krmi (JMPR, 1994).

Pri miših so po letu in pol krmljenja s klorfenvinfosom poročali še o spremembah adrenalnega korteksa (povečano pojavljanje ceroidnega pigmenta, žariščna hipertrofija in povečano pojavljanje nodularnih hiperplazij). Povečanega pojavljanja tumorjev pri miših niso zaznali. V študiji so določili odmerek, ki ni povzročil škodljivega učinka na organizem (NOAEL) 3,7 mg/kg tm/dan.

Pri podganah so poleg inhibicije AChE ugotovili tudi spremenjene koncentracije alfa, beta in gama globulinov, medtem ko niso zaznali povečanega pojavljanja tumorjev po dveh letih krmljenja s klorfenvinfosom. V študiji je bil določen NOAEL 0,15 mg/kg tm/dan.

Tudi v poročilu ATSDR (1997) zaključujejo, da klorfenvinfos ni rakotvoren.

2.1.2.4.4.2 Učinki na endokrini (hormonski) sistem

Poročil o učinkih na hormonski sistem pri ljudeh in drugih sesalcih nismo našli.

V študijah ponavljajoče se izpostavljenosti klorfenvinfosu pri podganah in psih, ki so 12 tednov dnevno prejeli 100 mg klorfenvinfosa/kg tm, ter psih, ki so dnevno prejeli 50 mg/kg tm, niso opazili makroskopskih ali mikroskopskih sprememb endokrinih organov (hipofiza, ščitnica, nadledvična žleza, trebušna slinava, spolne žleze). Tudi v študiji dolgoročne toksičnosti, kjer so bile podgan in miši dnevno izpostavljeni klorfenvinfosu v obdobju leta in pol (miši in dveh let (podgane), niso opazili škodljivih učinkov na endokrine organe (Ambrose et al., 1970).

Glej tudi točki 2.1.2.4.2 in 2.1.2.4.4.1.

2.1.2.4.4.3 Učinki na imunski sistem

Najnižji odmerek, pri katerem so ugotovili škodljive učinke (LOAEL) na imunski sistem je znašal pri miših 2 mg/kg tm/dan (ATSDR, 1997).

2.1.2.4.4.4 Učinki na živčni sistem

V študiji pri prostovoljcih, ki so 53 dni peroralno prejeli 3 mg klorfenvinfosa niso ugotovili nobenih nenormalnih kliničnih znakov, vendar pa aktivnost AChE ni bila določena (ATSDR, 1997).

Osem let so opazovali skupino 33 delavcev, ki so delali s klorfenvinfosom v proizvodnji sredstev za zaščito rastlin. V študijo so vključili tudi dve kontrolni skupini. V primerjavi s kontrolnimi skupinami so pri delavcih izpostavljenih klorfenvinfosu opazili znižane koncentracije hemoglobina v krvi in rahlo znižane aktivnosti plazemske in eritrocitne AChE. Pri delavcih so opazili tudi spremembo nekaterih fizioloških parametrov; nižje elektromiografske napetosti, povezane s počasnejšim pretokom, ki so se popravile v primeru odstranitve delavca z mesta izpostavljenosti klorfenvinfosu (JMPR, 1994).

Glej tudi točko 2.1.2.4.2.

2.1.2.4.5 Učinki na razmnoževanje in potomstvo

Dvogeneracijsko študijo strupenosti za razmnoževanje so izvedli s klorfenvinfosom na podganah. Pri starših in mladičih prve generacije, ki so prejeli najvišji odmerek klorfenvinfosa (5 mg/kg tm/dan) je bil znižan vnos hrane in pridobivanje telesne mase. Znižano aktivnost plazemske, eritrocitne in možganske AChE so izmerili pri samcih in samicah, ki so prejeli najvišji in srednji odmerek klorfenvinfosa (0,5 mg/kg tm). Pri najvišjem in srednjem odmerku, ki je bil toksičen za starše, so opazili povečano izgubo zarodkov pred implantacijo in pri najvišjem odmerku tudi po implantaciji zarodkov. Pri obeh odmerkih je bila tudi povečana izguba mladičev v obdobju do konca laktacije. Pri najvišjem odmerku je bilo znižano pridobivanje telesne mase mladičkov obeh generacij med laktacijo. NOAEL za starše in zarodke je bil 0,05 mg/kg tm/dan (JMPR, 1994).

V trogeneracijski študiji je klorfenvinfos znižal indeks preživetja in laktacije pri najnižjem uporabljenem odmerku 2,7 mg/kg tm/dan. Pri vseh odmerkih klorfenvinfosa (2,7, 8 in 24 mg/kg tm/dan) je bilo znižano pridobivanje telesne mase staršev. Teratogenih učinkov na mladiče v tej študiji niso opazili. V tej študiji NOAEL ni bil določen (JMPR, 1971).

Študija razvojne strupenosti klorfenvinfosa je bila izvedena na podganah. Pri brejih materah so ugotovili zmanjšano pridobivanje telesne mase med časom izpostavljenosti klorfenvinfosu. Učinkov na razvoj zarodkov niso opazili. V študiji je bil določen NOAEL za matere 1 mg/kg tm/dan, za razvojne učinke pa 3 mg/kg tm/dan.

Pri kuncih, kjer je bila tudi izvedena študija razvojne toksičnosti so pri materah, izpostavljenih vsem uporabljenim odmerkom klorfenvinfosa, opazili znižano aktivnost plazemske in eritrocitne AChE. Pri nizkem (25 mg/kg tm/dan) in najvišjem odmerku (100 mg/kg tm/dan) so opazili povečano predimplantacijsko izgubo zarodkov. V študiji je določen NOAEL za matere in razvojno toksičnost 100 mg/kg tm/dan (JMPR, 1994); s čimer se ne bi strinjali, saj so bili škodljivi učinki opaženi pri vseh odmerkih (25, 50 in 100 mg/kg tm/dan).

V poročilu JMPR, 1994, na kratko poročajo tudi o omejeni razvojni študiji na podganah, kuncih in hrčkih, kjer so pri odmerkih 50 mg/kg tm/dan in več pri hrčkih opazili povečano odpiranje oči in oteklino ter manjšo telesno maso in dolžino zarodkov.

2.1.2.4.6 Razvrstitev

V skladu s kriteriji Uredbe o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (1272/2008) bi klorfenvinfos razvrstili kot *Akutno toksičen kategorije 1*, H300 *Smrtno po zaužitju*, H310, *Smrtno v stiku s kožo* in H330, *Smrtno pri vdihavanju*.

Razvrščanje, označevanje in pakiranje nevarnih snovi in zmesi določa Uredba ES 1272/2008. V Aneksu VI k omenjeni uredbi so navedene usklajene razvrstitve snovi, ki jih je odobril Odbor za oceno tveganja (Risk Assessment Committee) pri Evropski agenciji za kemikalije (ECHA). Za klorfenvinfos obstaja usklajena razvrstitev v Aneksu VI Uredbe 1272/2008, ki je *Akutno toksičen kat. 2*, H300, *Smrtno pri zaužitju*, H311, *Strupeno v stiku s kožo*. Razvrstitev se razlikuje od te, ki bi jo predlagali na podlagi v tem dokumentu povzetih študij. Vzrok za drugačno razvrstitev je verjetno predložena dokumentacija, ki je bila drugačna, od te do katere smo dostopali mi.

2.1.2.4.7 Kritični odmerek in referenčni (varni) odmerki

Znižanje aktivnosti plazemske, eritrocitne in možganske acetilholinesteraze je kritični učinek, ki so ga opazili v študijah akutne in ponavljajoče se izpostavljenosti tako pri človeku kot pri drugih sesalcih (JMPR, 1971; JMPR, 1994; ATSDR, 1997; NRA, 2010).

Akutni referenčni odmerek (ARfD) za klorfenvinfos 0,002 mg/kg tm/dan je bil določen v oceni aktivne snovi, ki jo je pripravil ATSDR (1997), in sicer na podlagi LOAEL 2,4 mg/kg tm/dan. To je bil najnižji odmerek pri katerem je pri podganah prišlo do 52% inhibicije plazemske in 30% inhibicije eritrocitne AChE. Za izračun ARfD so tako uporabili faktor ocenjevanja 1000. Deset zaradi razlik v toksikokinetiki in toksikodinamiki med vrstami in 10 zaradi teh razlik med ljudmi, dodatni faktor 10 pa zaradi uporabe LOAEL namesto NOAEL.

ADI je določen na podlagi najnižjega odmerka klorfenvinfosa (NOAEL), ki v študijah na poskusnih živalih, pri najbolj občutljivi vrsti, ni povzročil škodljivega učinka. V pregledu toksikoloških študij klorfenvinfosa, ki jo je opravil JMPR leta 1994 je bil najnižji NOAEL določen v dvogeneracijski študiji na podganah in to je 0,05 mg/kg tm/dan. Ob upoštevanju razlik v toksikokinetiki in toksikodinamiki med vrstami (10) in med ljudmi (10), so za izračun ADI uporabili faktor ocenjevanja 100. ADI za klorfenvinfos je tako 0,0005 mg/kg tm/dan (JMPR, 1994); to vrednost je privzela tudi Evropska komisija.

2.2 Ocena izpostavljenosti

Pri izračunu smo predvidevali, da je povprečna telesna masa odrasle osebe 60 kg (HEEG Opinion, 2013), ki temelji na povprečni telesni masi ženk med 30. in 40. letom starosti. Uporabljena vrednost je nižja od povprečne telesne mase 70 kg, ki jo navaja smernica o izbranih privzetih vrednostih, ki jih uporabljajo znanstveni odbori EFSA (2012), a se nam zdi uporaba 60 kg povprečne telesne mase upravičena. Za otroke od enega do treh let smo upoštevali, da je povprečna telesna masa 10 kg, za otroke od 3-10 let pa 23,2 kg.

Za otroke mlajše od enega leta starosti je uporaba medu odsvetovana zaradi morebitnega alergene delovanja in možnosti botulizma kot posledico okužbe s spori bakterije *Clostridium botulinum*. Iz tega razloga nismo pripravili ocene izpostavljenosti amitrazu pri uživanju medu za otroke do enega leta starosti.

2.2.1 Količina zaužitega medu

Za oceno izpostavljenosti smo privzeli podatke o zaužiju medu pri prebivalcih držav članic ES (EFSA, 2011). Odrasli prebivalci Slovenije zaužijejo v povprečju 26 g medu/dan, medtem ko ekstremni jedci (95 percentil) zaužijejo 40 g medu/dan. Podatkov o uživanju medu pri slovenskih otrocih EFSA (2011) ne navaja. Zato smo privzeli povprečne podatke za države članice EU, po katerih zaužijejo otroci do 3. leta starosti v povprečju 8 g medu/dan, ekstremni jedci (95 percentil) med temi pa 20 g medu/dan, medtem ko starejši otroci zaužijejo v povprečju 11 g medu/dan, ekstremni jedci med temi otroci (95 percentil) pa 28 g medu/dan.

2.2.2 Količina prežvečenega satja (voska)

Podatkov o količini prežvečenega satja ne poznamo.

2.2.3 Izpostavljenost amitrazu pri uživanju medu

V okviru izrednega uradnega nadzora je bilo na prisotnost amitraza preiskanih 20 vzorcev medu (Tabela 1, Priloge 1). V 5 vzorcih medu so določili prisotnost amitraza; 0,063 mg/kg, 0,069 mg/kg, 0,11 mg/kg, 0,14 mg/kg, 0,14 mg/kg medu. Najvišja izmerjena koncentracija amitraza v medu je bila 0,14 mg/kg medu.

Upoštevajoč največjo izmerjeno količino ostankov amitraza v medu, to je 0,14 mg/kg medu, smo izračunali, da bi povprečni odrasli jedec medu zaužil 0,00007 mg amitraza/kg tm/dan, medtem ko bi ekstremni jedec medu zaužil 0,0001 mg amitraza/kg tm/dan.

Upoštevajoč največjo izmerjeno količino ostankov amitraz v medu, to je 0,14 mg/kg medu, smo izračunali, da bi otrok s tm 10 kg, ki uživa povprečno količino medu/dan zaužil 0,0001 mg amitraza/kg tm/dan, ekstremni jedec pa 0,0003 mg amitraza/kg telesne mase/dan.

2.2.4 Izpostavljenost amitrazu pri žvečenju voska (satja)

V okviru izrednega uradnega nadzora je bilo na prisotnost amitraza preiskanih 20 vzorcev voska (satja) (Tabela 2, Priloge 1). V sedmih vzorcih so določili prisotnost amitraza: 1,2 mg/kg, 0,26 mg/kg, 0,38 mg/kg, 1,4 mg/kg, 0,31 mg/kg, 4,1 mg/kg in 0,21 mg/kg. Najvišja izmerjena koncentracija amitraza je bila 4,1 mg/kg voska.

Ker količina prežvečenega voska (satja) ni znana, ni možno izračunati izpostavljenosti amitrazu.

2.2.5 Izpostavljenost klorfenvinfosu pri uživanju medu

V okviru izrednega uradnega nadzora je bilo na prisotnost klorfenvinfosu preiskanih 20 vzorcev medu (Tabela 1, Priloge 1). Klorfenvinfosu v medu niso našli.

2.2.6 Izpostavljenost klorfenvinfosu pri žvečenju voska (satja)

V okviru izrednega uradnega nadzora je bilo na prisotnost klorfenvinfosu preiskanih 20 vzorcev medu in voska (satja z medom). V 7/20 vzorcev satja z medom so določili prisotnost klorfenvinfosu; 0,26 mg/kg, 0,14 mg/kg, 0,17 mg/kg, 0,21 mg/kg, 0,49 mg/kg, 0,49 mg/kg, 0,71 mg/kg in 0,058 mg/kg medu. Najvišja izmerjena koncentracija klorfenvinfosu v vosku (satju) je bila torej 0,71 mg/kg voska.

Ker količina prežvečenega voska (satja) ni znana, ni možno izračunati izpostavljenosti klorfenvinfosu.

2.3 Ocena tveganja

2.3.1 Ocena tveganja za amitraz v medu

2.3.1.1 Odrasli

Ekstremni odrasli jedec medu s tm 60 kg bi ob uživanju 40 g medu/dan, v katerem so našli 0,14 mg amitraza/kg medu zaužil 0,0001 mg amitraza/kg tm/dan. To je 100 krat manjši odmerek amitraza, kot je referenčna vrednost za enkratni vnos (ARfD=0,01 mg/kg tm/dan) in 30 krat manjši odmerek kot je sprejemljivi dnevni vnos za dolgotrajno izpostavljenost (ADI=0,003 mg/kg tm/dan).

Odrasli bi lahko na enkrat pojedel 5000 g medu, oziroma vsak dan vse življenje 1280 g medu brez tveganja za zdravje.

Med z ostanki amitraza ne predstavlja tveganja za zdravje odraslih.

2.3.1.2 Otroci

Majhen otrok s tm 10 kg bi ob uživanju 20 g medu/dan (ekstremni jedec), v katerem so našli 0,14 mg amitraza/kg medu zaužil 0,0003 mg amitraza/kg telesne mase/dan. To je 30 krat manjši odmerek amitraza, kot je referenčna vrednost za enkratni vnos (ARfD je 0,01 mg/kg tm/dan) in 10 krat manjši odmerek kot je sprejemljivi dnevni vnos za dolgoročno izpostavljenost (ADI je 0,003 mg/kg tm/dan).

Majhen otrok s tm 10 kg bi lahko naenkrat pojedel 714 g medu, oziroma vsak dan 214 g medu brez tveganja za zdravje.

Ker izpostavljenost pri otrocih s telesno maso 10 kg zagotavlja dovolj velik rob varnosti, smo logično sklepali, da bo enako tudi pri otrocih z večjo telesno maso.

Med z ostanki amitraza ne predstavlja tveganja za zdravje otrok.

2.3.2 Ocena tveganja za amitraz v vosku (satju)

Ker ni možno izračunati izpostavljenosti klorfenvinfosu, ni možno okarakterizirati tveganja.

Zato smo ocenili količino voska/satja, ki bi ga lahko brez tveganja za zdravje prežvečili odrasli

- naenkrat oz. v krajšem časovnem obdobju (14 dni) upoštevajoč ARfD 0,01 mg/kg tm/dan,
- dolgoročno, vsak dan, tekom celega življenja upoštevajoč ADI 0,003 mg/kg tm/dan.

2.3.2.1 Sprejemljiva količina prežvečenega voska (satja) za odrasle

Za odrasle s tm 60 kg znaša sprejemljiva enkratna oz. kratkotrajna izpostavljenost amitrazu 0,6 mg/dan, sprejemljiva dolgoročna izpostavljenost pa 0,18 mg/dan. Odrasli bi lahko brez tveganja za zdravje zaradi izpostavljenosti klorfenvinfosu naenkrat oz. v krajšem časovnem obdobju prežvečili 146 g voska (satja)/dan, dolgoročno pa 44 g voska(satja)/dan, ki vsebuje 4,1 mg klorfenvinfosa/kg voska.

2.3.2.2 Sprejemljiva količina prežvečenega voska (satja) za otroke

Za otroke s tm 10 kg znaša sprejemljiva enkratna oz. kratkotrajna izpostavljenost amitrazu 0,1 mg/dan, sprejemljiva dolgoročna izpostavljenost pa 0,03 mg/dan. Otroci s tm 10 kg bi lahko brez tveganja za zdravje zaradi izpostavljenosti amitrazu naenkrat oz. v krajšem časovnem obdobju prežvečili 24,4 g voska (satja)/dan, dolgoročno pa 7 g voska(satja)/dan, ki vsebuje 4,1 mg amitraza/kg voska.

Za otroke s tm 23,2 kg znaša sprejemljiva enkratna oz. kratkotrajna izpostavljenost amitrazu 0,23 mg/dan, sprejemljiva dolgoročna izpostavljenost pa 0,07 mg/dan. Otroci s tm 23,2 kg bi lahko brez tveganja za zdravje zaradi izpostavljenosti amitrazu naenkrat oz. v krajšem časovnem obdobju prežvečili 56 g voska (satja)/dan, dolgoročno pa 16 g voska(satja)/dan, ki vsebuje 4,1 mg amitraza/kg voska.

2.3.3 Ocena tveganja za klorfenvinfos v vosku (satju)

Ker ni možno izračunati izpostavljenosti klorfenvinfosu, ni možno okarakterizirati tveganja.

Zato smo ocenili količino voska/satja, ki bi ga lahko brez tveganja za zdravje prežvečili

- naenkrat oz. v krajšem časovnem obdobju (14 dni) upoštevajoč ARfD 0,002 mg/kg tm/dan,
- dolgoročno, vsak dan, tekom vsega življenja upoštevajoč ADI 0,0005 mg/kg tm/dan.

2.3.3.1 Sprejemljiva količina prežvečenega voska (satja) za odrasle

Za odrasle s tm 60 kg znaša sprejemljiva enkratna oz. kratkotrajna izpostavljenost klorfenvinfosu 0,12 mg/dan, sprejemljiva dolgoročna izpostavljenost pa 0,03 mg/dan. Odrasli bi lahko brez tveganja za zdravje zaradi izpostavljenosti klorfenvinfosu naenkrat oz. v krajšem časovnem obdobju prežvečili 169 g voska (satja)/dan, dolgoročno pa 42 g voska(satja)/dan, ki vsebuje 0,71 mg klorfenvinfosa/kg voska.

2.3.3.2 Sprejemljiva količina prežvečenega voska (satja) za otroke

Za otroke s tm 10 kg znaša sprejemljiva enkratna oz. kratkotrajna izpostavljenost klorfenvinfosu 0,02 mg/dan, sprejemljiva dolgoročna izpostavljenost pa 0,005 mg/dan. Otroci s tm 10 kg bi lahko brez tveganja za zdravje zaradi izpostavljenosti klorfenvinfosu naenkrat oz. v krajšem časovnem obdobju prežvečili 28 g voska (satja)/dan, dolgoročno pa 7 g voska(satja)/dan, ki vsebuje 0,71 mg klorfenvinfosa/kg voska.

Za otroke s tm 23,2 kg znaša sprejemljiva enkratna oz. kratkotrajna izpostavljenost klorfenvinfosu 0,046 mg/dan, sprejemljiva dolgoročna izpostavljenost pa 0,012 mg/dan. Otroci s tm 23,2 kg bi lahko brez tveganja za zdravje zaradi izpostavljenosti klorfenvinfosu naenkrat oz. v krajšem časovnem obdobju prežvečili 65 g voska (satja)/dan, dolgoročno pa 16 g voska(satja)/dan, ki vsebuje 0,71 mg klorfenvinfosa/kg voska.

Ocenili smo količino voska (satja) z ostanki amitraza in klorfenvinfosa, ki bi ga lahko brez tveganja za zdravje prežvečili odrasli in otroci naenkrat oz. v krajšem časovnem obdobju (14 dni) ali dolgoročno, vsak dan, tekom vsega življenja ob predpostavki, da bi ostanki v celoti prehajali iz voska v slino (glej točki 2.3.2 in 2.3.3). Ker je klorfenvinfos slabo topen v vodi, zaradi česar ni prehajal v med (glej točko 2.1.2.1 in Tabela 3, Priloge 1) sklepamo, da bi bilo podobno tudi s prehajanjem klorfenvinfosa iz voska (satja) v slino. Zato menimo, da so relevantnejše količine voska, ki smo jih izračunali kot sprejemljive zaradi vsebnosti amitraza.

2.3.4 Ocena tveganja zmesi

Strupenost zmesi nedvomno predstavlja precejšen izziv za ocenjevalce tveganja. Pri oceni tveganja zmesi smo upoštevali skupno stališče znanstvenih odborov Evropske komisije za tveganja za zdravje zaradi okoljskih dejavnikov, za nova tveganja in za varnost potrošnikov (SCHER, SCENIHR in SCCS, 2012):

- V določenih razmerah je učinek zmesi kemikalij drugačen kot učinek posamezne kemikalije.
- Kemikalije z enakimi načini delovanja delujejo tako, da pride do kombinacije učinkov, ki so večji kot učinki posamezne kemikalije, in sicer bo učinek odvisen od vsote odmerkov, tkim. aditivni učinek.
- Za kemikalije z različnimi načini delovanja (neodvisno delovanje) ne obstajajo trdi dokazi, da pride do škodljivih učinkov, v kolikor je odmerek posamezne kemikalije v zmesi enak oziroma nižji, kot je odmerek brez učinka. Ob tem se je potrebno zavedati, da se referenčni odmerki določajo na podlagi odmerkov brez učinka ob upoštevanju faktorjev ocenjevanja, iz česar sledi, da so referenčni odmerki zelo konservativni. A vendar je potrebno proučiti negotovosti pri določanju referenčne vrednosti za posamezno kemikalijo v zmesi. Ta pristop ni primeren za snovi, ki nimajo praga učinka.
- Poleg načina delovanja in velikosti izpostavljenosti je potrebo upoštevati tudi potencialno kopičenje kemikalij, odnos med strukturo in aktivnostjo kemikalije ter morebitne znane interakcije.
- Do interakcij (antagonizma, potenciranja oz. sinergije) navadno pride pri srednje visokih oziroma visokih odmerkih, medtem ko so pri nizkih odmerkih te interakcije malo verjetne oziroma toksikološko nepomembne.
- Glede na neskončno število možnih kombinacij, ki smo jim izpostavljeni, se je smiselno osredotočiti na potencialno zaskrbljujoče zmesi.
- V zvezi z oceno zmesi sta ključna izziva pomanjkanje podatkov o izpostavljenosti in pomanjkanje podatkov o mehanizmi delovanja. Zaenkrat ne obstaja seznam mehanizmov delovanja niti kriteriji za opredelitev oz. napoved načina delovanja za kemikalije, o katerih obstaja malo podatkov.
- Če ne poznamo mehanizma delovanja, se priporoča uporaba aditivnega pristopa.
- Za napoved učinkov zmesi se priporoča ekspertna presoja za vsak primer posebej.

Pri snoveh z različnimi mehanizmi delovanja SCHER, SCENIHR in SCCS (2012) priporočajo še presojo v zvezi z naslednjimi vprašanji:

- Ali katera od snovi v zmesi pomembno poveča absorpcijo druge/ih?

-
- Ali katera od snovi v zmesi pomembno zavre izločanje/klirens druge(ih)?
 - Ali je strupenost katere od snovi v zmesi odvisna od metabolne aktivacije in ali katera od snovi v zmesi inducira presnovne encime, ki so potrebni za metabolno aktivacijo?
 - Ali lahko dve ali več snov v zmesi delujejo na različne encime na pomembni presnovni poti?
 - Ali lahko dve ali več snov v zmesi delujejo na različne elemente zaščitnih in popravljalnih mehanikov v celicah?

2.3.4.2 Ocena tveganja za interakcije med amitrazom in klorfenvinfosom

Amitraz in klorfenvinfos imata različne mehanizme delovanja. Amitraz je agonist adrenergičnih receptorjev α in antagonist histaminskih receptorjev; v višjih koncentracijah inhibira tudi encima PG sintetazo in MAO. Klorfenvinfos je inhibitor encima acetilholinesteraze. Mehanizmi delovanja so podrobno opisani v točkah 2.1.1.2 in 2.1.2.2.

Za kemikalije z različnim načinom delovanja ni dokazov, da povzročajo škodljive učinke, v kolikor prisotnost posamezne kemikalije ne presega zanjo določene referenčne vrednosti. Odmerkov amitraza in klorfenvinfos, ki bi jim bili izpostavljeni odrasli in otroci pri žvečenju voska ni možno oceniti (glej točki 2.2.4 in 2.2.6), vendar menimo, da je malo verjetno, da bi presegali referenčne odmerke.

Glede na kemijsko strukturo spada amitraz v skupino formamidinskih pesticidov in po svoji strukturi ni podoben klorfenvinfosu, ki spada med organofosfatne pesticide. Amitraz in klorfenvinfos se v organizmih ne kopičita. Glej točki 2.1.1.1 in 2.1.2.1.

Podatkov o medsebojnem vplivu amitraza in klorfenvinfos na absorpcijo in izločanje nismo našli. Oba se izdatno presnovita v jetrih s citokromi P450, medtem ko se klorfenvinfos delno presnovi že v plazmi s hidrolizo. Amitraz inducira jetrne encime, zaradi česar bi teoretično pričakovali, da se bo klorfenvinfos v prisotnosti amitraza hitreje presnovil. Po posedaj znanih podatkih se oba pesticida pretežno izločata iz organizma v obliki številnih metabolitov z urinom. Glej tudi točke: 2.1.1.3, 2.1.2.3 in 2.1.2.3.1.

Na podlagi upoštevanja navedenih dejstev zaključujemo, da so škodljive interakcije med amitrazom in klorfenvinfosom malo verjetne, vendar bi za natančnejšo proučitev morebitnih interakcij potrebovali nove eksperimentalne podatke.

3 Ovrednotenje ocene tveganja

3.1 Negotovosti

Od določitve referenčnih odmerkov za amitraz je bilo narejenih več novih študij. V času, ki nam je bil na voljo za pripravo te ocene tveganja nismo uspeli preučiti vseh novejših študij.

Večina metabolitov ni bila toksikološko testirana in ne poznamo možnih toksičnih vplivov na organizem.

V povezavi z učinki kemijskih povzročiteljev hormonskih motenj (KPHM) oz. hormonskimi motilci, kot jih popularno imenujejo, obstajajo v strokovnih krogih številna nasprotujoča si stališča in negotovosti kot so: obstoj praga učinka, učinki pri nizkih odmerkih, pomen ne-monotonega odnosa med odmerkom in učinkom, učinki zmesi, izpostavljenost v kritičnih obdobjih občutljivosti, to je v času razvoja in programiranja hormonskega sistema zarodka med nosečnostjo, v otroštvu in adolescenci, neustreznost testnih metod za ugotavljanje izidov pri nizkih odmerkih in v kritičnih razvojnih obdobjih ter pomanjkanje ustreznih modelov za nekatere učinke (Munn in Goumenou, 2013). Vendar našteje negotovosti niso ekskluzivne za KPHM. Ravno zaradi negotovosti se za določitev referenčnih odmerkov uporabljajo faktorji ocenjevanja. Glej točko 2.1.

Pri oceni izpostavljenosti za otroke smo uporabili podatke o količinah zaužitega medu povprečja drugih držav članic ES (EFSA, 2011), ker slovenskih podatkov nimamo na voljo.

Pri oceni izpostavljenosti amitrazu smo upoštevali le podatke vnosa z medom. Izpostavljenost ostankom amitraza kot zdravila za veterinarsko uporabo je možna tudi zaradi uživanja drugih živil živalskega izvora (meso, mleko). Verjetnost za izpostavljenost z uživanjem živil rastlinskega izvora je majhna, ker amitraz v ES ni registriran kot sredstvo za zaščito rastlin.

Iz dostopnih (objavljenih) podatkov ni mogoče sklepati, da je bil pripravek za zdravljenje varoze razvit, izdelan, distribuiran in uporabljen skladno z zakonodajo in smernicami s področja zdravil za uporabo v veterinarski medicini (Direktiva 2001/82/ES Evropskega parlamenta in Sveta o zakoniku Skupnosti o zdravilih za uporabo v veterinarski medicini, z vsemi spremembami; Zakon o zdravilih Uradni list RS 17/14, s podzakonskimi predpisi; Volumen 4 EudraLex 2016, smernice VICH). Zaradi tega kakovost izdelka, oziroma njegovih sestavin (npr. kvantitativna in kvalitativna sestava nečistot), ki bi lahko (ali pa ne) vplivale na uporabnike (potrošnike) medu in/ali satja ni zagotovljena. Skladnost z veljavnimi predpisi je še posebej pomembna pri zdravilih, ki se uporabljajo pri živalih namenjenih za proizvodnjo živil.

Poleg negotovosti, ki jo neznana (ali le delno poznana) kakovost uporabljenih učinkovin in izdelka vnaša v oceno tveganja, je zaradi navedenega oteženo vrednotenje učinkovitosti izdelka (in njegovih učinkovin) in varnosti za ciljno živalsko vrsto (čebele), uporabnike (čebelarje) in okolje.

4 Zaključki in priporočila

Med z ostanki amitraza ne predstavlja tveganja za zdravje odraslih niti za zdravje otrok, ne pri kratkotrajnem ne pri dolgotrajnem uživanju.

Izpostavljenosti amitrazu in klorfenvinfosu pri žvečenju voska (satja) nismo mogli kvantificirati, ker nismo imeli na voljo podatkov o količini satja, ki jo potrošniki žvečijo. Zato smo ocenili, koliko voska (satja) bi potrošniki smeli požvečiti, ne da bi to predstavljal tveganje za zdravje, čeprav je malo verjetno, da bi do izpostavljenosti sploh prišlo, ker vosek, ki je bil analiziran v izrednem nadzoru, ni bi namenjen za prodajo.

Med je v Sloveniji zelo cenjeno živilo in je tudi sestavina tradicionalnega slovenskega zajtrka. Zato bilo smiselno pridobiti podatke, koliko medu zaužijejo slovenski otroci, da bi bilo možno napraviti oceno izpostavljenosti na podlagi dejanskih podatkov in ne na podlagi podatkov pridobljenih v drugih državah članicah ES.

Predlagamo vzpostavitev jasnih komunikacijskih poti med institucijami, ki so pristojne za nadzor in analizo tveganja,⁷ da bi do največje možne mere zmanjšali zaskrbljenost potrošnikov, do katere je v konkretnem primeru prišlo, tudi zaradi nepreciznega in neusklajenega komuniciranja.

Kljub preteklim pobudam izvajanje ocen tveganja za zdravje ljudi še vedno ni ustrezno urejeno (Perharič, 2012). Ponovno predlagamo, da se izvajanje ocene tveganja sistemsko uredi na medinstitucionalni in medresorski ravni.

Menimo, da zaključki ocene tveganja ne smejo vplivati na ukrepe v zvezi s proizvodnjo in uporabo ilegalnega pripravka za zdravljenje varoj. Pripravek ni bil razvit, izdelan, distribuiran in uporabljen skladno z zakonodajo in smernicami s področja zdravil za uporabo v veterinarski medicini in zato ne ustreza zahtevanim standardom kakovosti.

⁷ Analiza tveganja je triada ocene tveganja, upravljanja tveganja in komunikacije tveganja.

5 Viri

Ambrose AM, Larson PS, Borzelleca JF, Henningar GR Jr. 1970. Toxicologic studies on Diethyl-1-(2,4-Dichlorophenyl)-2-Chlorovinyl phosphite. *Toxicol Appl Pharmacol* 17:323-336.

ATSDR (Agency for toxic substances and disease registry). 1997. Toxicological profile for Chlorfenvinphos, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Privzeto 17.12.2015 s spletne strani: (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp83.pdf>)

Avsarogullari L, Ikizceli I, Sungur M, Sözüer E, Akdur O, Yücei M. 2006. Acute amitraz poisoning in adults: clinical features, laboratory findings, and management. *Clin Toxicol (Phila)* 44:19-23.

Balayiannis G, Balayiannis P. 2008, Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Arch Environ Contam Toxicol* 55:462-70.

Barna J, Simon G. 1973. The effect of chlorfenvinphos insecticide in small often repeated dose. *Cereal Res Commun* 1: 33-44.

Bizjak A. 2015. Poročilo o posebnem nadzoru nad proizvodnjo, prometom in uporabo pripravkov za zatiranje varoj v letu 2015. Inšpekcija za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin. Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin. Ljubljana.

Boi M, Serra G, Colombo R, Lodesani M, Massi S, Costa C. 2015. A 10 year survey of acaricide residues in beeswax analysed in Italy. *Pest Manag Sci*, DOI: 10.1002/ps.4161.

CTGB (Board for the authorisation of Plant protection products and Biocides). 2014. Evaluation Manual for the Authorisation of Plant protection products and Biocides according to Regulation (EC) No 1107/2009. EU part Plant protection products. Chapter 3. Analytical Methods. Version 2.0. Privzeto 22. 12. 2015 s spletne strani: <http://ctgb.nl/docs/default-source/evaluation-manuals/evaluation-manual-ppp-1107-2.0/evaluation-manual-plant-protection-products-eu---3---analytical-methods-version-2-2014.pdf?sfvrsn=2>.

Del Pino J, Martinez MA, Castellano VJ, Ramos E, Martinez-Larranaga MR, Anadon A. 2011. Effects of prenatal and postnatal exposure to amitraz on norepinephrine, serotonin and dopamine levels in brain regions of male and female rats. *Toxicol* 287: 145–152.

Del Pino J, Moyano-Cires PV, Anadon MJ, Díaz MJ, Lobo M, Capo MA, Frejo MT. 2015. Molecular Mechanisms of Amitraz Mammalian Toxicity: A Comprehensive Review of Existing Data. *Chem Res Toxicol* 28: 1073–1094.

Drofenik J. 2016. Postopek določitve velikosti vzorca. Sektor za fitofarmacevtska sredstva, L Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (osebna komunikacija)

ECB-IHCP (European Chemicals Bureau. Institute for health and consumer protection). 2003. *Technical guidance document on risk assessment Part I*. European Commission. Joint research centre. Ispra, Italy. Privzeto 6.1.2016 s spletne strain https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart1_2ed_en.pdf.

EFSA (European Food Safety Authority). 2003. Amitraz. List of endpoints-Draft assesment report for inclusion of Amitraz to Annex 1 of Directive 91/414/EEC.

EFSA (European Food Safety Authority). 2011. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. EFSA J; 9(11):2406. Privzeto 18.12. 2015 s spletne strani: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2406.pdf

EFSA (European Food Safety Authority). 2012. Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. EFSA J;10(3):2579.

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Product). 1999. Committee for veterinary medicinal products. Amitraz (bees). Summary report. Privzeto 21.12.2015 s spletne strani http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500010419.pdf

EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines. Privzeto 14.1.2016 s spletne strani http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm.

Flockhart DA. 2007. *Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table*. Indiana University School of Medicine. Privzeto 21. 12. 2015 s spletne strani: <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/main-table/>.

Gilbert ME. 1988. Formamidine pesticides enhance susceptibility to kindled seizures in amygdala and hippocampus of the rat. *Neurotoxicol Teratol* 10: 221–227.

Goldman JM, Cooper RL. 1993. Assessment of Toxicant-Induced Alterations in the Luteinizing Hormone Control of Ovulation in the Rat, in *Female Reproductive Toxicology* (v Heindel J, Chapin, R, Ur.); 79–91, Academic Press, San Diego, California.

HEEG (Human Exposure Expert Group) Opinion), 2013. Default human factor values for use in exposure assessments for biocidal products, European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection, Chemical assessment and testing. Privzeto 17.12.2015 s spletne strani http://echa.europa.eu/documents/10162/19680902/heeg_opinion_17_default_human_factor_values_en.pdf

HSDB (Hazardous Substances Databank). 2003. Chlorfenvinphos. Privzeto 7.1. 2016 s spletne strani: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+470-90-6>.

Institoris L, Banfi H, Lengyel Z, Papp A, Nagymajtenyi L. 2007. A study on immunotoxicological effects of subacute amitraz exposure in rats. *Hum Exp Toxicol* 26: 441–445.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). 2009. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Environmental Health Criteria Series 240. Food and Agriculture Organization of the United Nation and World Health Organization. Geneva.

IPCH Inchem

JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues). 1971. Chlorfenvinphos, WHO Pesticide residues Series, No.1, Pesticide Residues in Food: Report of the 1971 Joint Meeting of the FAO Working Party of Experts on Pesticide Residues on the WHO Expert Committee on Pesticide Residues, 1972, No. 88.

JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues). 1994. Chlorfenvinphos, Joint Meeting of the FAO Working Party of Experts on Pesticide Residues on the WHO Expert Committee on Pesticide Residues, 1994, No. 877.

JMPR. (Joint Meeting on Pesticide Residues). 1998, Evaluations Part II: Toxicological WHO/PCS/99.18, WHO Pesticide Residues in Food, No 14, Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1998.

Privzeto 1.2.2016 s spletne strani <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v098pr02.htm>

Kim JC, Shin JY, Yang YS, Shin DH, Moon CJ, Kim SH, Park SC, Kim YB, Kim HC, Chung MK. 2007. Evaluation of developmental toxicity of amitraz in Sprague-Dawley rats. Arch Environ Contam Toxicol 52: 137-144.

Lim JH, Kim SH, Kim KH, Park NH, Shin IS, Moon C, Park SH, Kim JC. 2010. Reproductive and developmental toxicity of amitraz in Sprague-Dawley rats. Toxicol Res 26: 67-74.

Moser VC, Boyes WK, MacPhail RC. 1987. Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. I. Effects on operant performance. Fundam Appl Toxicol 9: 131-139.

Munn S, Goumenou M. 2013. Thresholds for Endocrine Disrupters and Related Uncertainties Report of the Endocrine Disrupters Expert Advisory Group. Ispra: European Commission. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection. Privzeto 10.12. 2013 s spletne strani: <https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/lb-na-26-068-en-n.pdf>.

NRA (National Registration Authority). 2010. The National Registration Authority review Chlorfenvinphos, interim report, National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, Australia. Privzeto 4.1.2016 s spletne strani: <http://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14721-chlorfenvinphos-irr-ohs.pdf>

Osicka-Koprowska A, Lipska M, Wysocka-Paruszevska B. 1984. Effects of chlorfenvinphos on plasma corticosterone and aldosterone levels in rats. Arch Toxicol 55:68-69.

Padula G, Ponzinibbio MV, Picco S, Seoane A. 2012. Assessment of the adverse effects of the acaricide amitraz: in vitro evaluation of genotoxicity. Toxicol Mech Methods 22: 657-661.

Perharič L. 2012. Ocena tveganja dejavnikov iz okolja na Inštitutu za varovanje zdravja. ISIS; januar: 25-28.

Perharič L, Pollak P. 2013. Identifikacija ocenjevalcev tveganja okoljskih dejavnikov. eNBOZ; december 2013: 15-22. Privzeto 14. 1. 2016 s spletne strani: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/enboz_dec_2013.pdf

Posedi J. 2016. Satje z medom (vosek) v analiziranih vzorcih. Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (osebna komunikacija).

Radakovic M, Stevanovic J, Djelic N, Lakic N, Knezevic-Vukcevic J, Vukovic-Gacic B, Stanimirovic Z. 2013. Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the Comet assay. J Biosci (New Delhi, India) 38: 53-62.

Safe S, Wormke M. 2003. Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* 16: 807-816.

SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks), SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) 2012. Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. European Commission. Directorate General for health and consumers: Brussels.

Smith BE, Hsu WH, Yang PC. 1990. Amitraz induced glucose intolerance in rats: antagonism by yohimbine but not by prazosin. *Arch Toxicol* 64: 680–683.

VICH Guidelines Impurities. Privzeto 10.1.2016 na spletni strani: <http://www.vichsec.org/guidelines/pharmaceuticals/pharma-quality/impurities.html>

Timbell J. 2008. Paradoks strupa. Kemikalije kot prijateji in sovražniki. Inštiut RS za varovanje zdravja, Ljubljana.

Ueng TH, Hung CC, Wang HW, Chan PK. 2004. Effects of amitraz on cytochrome P450-dependent monooxygenases and estrogenic activity in MCF-7 human breast cancer cells and immature female rats. ***Food Chem Toxicol* 42:1785-1794.**

USEPA (United States Environmental Protection Agency) 1996. Amitraz Reregistration Eligibility Decision (RED), Case 0234 (EPA-738-F-96-031), US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticide and Toxic Substances, Washington, DC.

USEPA 2006 Report of the Food Quality Protection Act (FQPA) Tolerance Reassessment Progress and Risk Management Decision (TRED) for Amitraz. US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticide and Toxic Substances, Washington, DC. Privzeto 20.1.2016 s spletne strani http://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/amitraz_tred.pdf.

VICH Guidelines on Impurities. Dostopno na naslovu (januar 2016): <http://www.vichsec.org/guidelines/pharmaceuticals/pharma-quality/impurities.html>

Znoj V. 2016. Pojasnila o rezultatih analiz medu, medu s satjem in voska. in satja Postopek določitve velikosti vzorca. Sektor za živila, krmo in zdravila. Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (osebna komunikacija).

Priloga 1

Tabela 1: Rezultati analiz medu namenjenega za prodajo (720 ml kozarci) - koncentracije kemikalij so izražene v miligramih na kilogram medu

Lab. št.	UVHV VR št. vzorca	Datum vzorčenja	Amitraz (mg/kg)	Deguelin (mg/kg)	Klorfenvinfos (mg/kg)	Rotenon (mg/kg)	Tefrozin (mg/kg)	Etilbenzen (mg/kg)	Evgenol (mg/kg)	Naftalen (mg/kg)	1-Metilnaftalen (mg/kg)	2-Metilnaftalen (mg/kg)	m,p- Ksilen (mg/kg)	o- Ksilen (mg/kg)
18190	002458	04.08.2015	0,069	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18191	019861	04.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18269	021906	04.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18319	006910	05.08.2015	0,063	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18320	006911	05.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18321	009310	05.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18324	019189	04.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18328	011893	04.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18330	014651	05.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18339	019191	04.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18341	007434	04.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18347	021280	04.08.2015	0,101	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18361	014443	05.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18408	010424	05.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18411	010414	05.08.2015	0,104	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18414	010416	05.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18416	001597	05.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
18418	001411	05.08.2015	<0,005	<0,010	<0,001	<0,010	<0,010	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020

18	7	015	05	10	01	10	10	20	20	20	20	20	20	20
184	00184	05.08.2	<0,	<0,0	<0,	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0
19	2	015	05	10	01	10	10	20	20	20	20	20	20	20
184	00185	05.08.2	0,1	<0,0	<0,	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0
20	0	015	4	10	01	10	10	20	20	20	20	20	20	20

Tabela 3: Rezultati analiz medu natočenega iz vzorcev satje z medom – koncentracije kemikalij so izražene v miligramih na kilogram medu

Ta med ni bil namenjen za prodajo. Analiza se je izvedla zgolj v tistih vzorcih, kjer so našli ostanke v satju(vosku). V medu so analizirali tiste snovi, ki so jih ugotovili v vosku. Torej, če so našli v vosku le amitraz, so v medu iztočenem iz tega satja analizirali le amitraz.

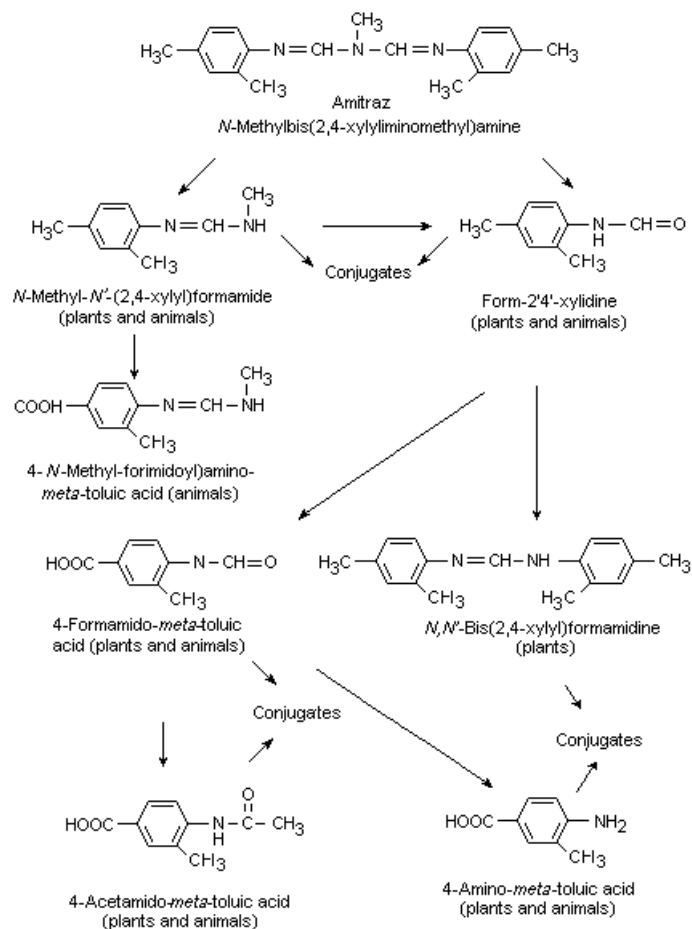
Lab. št.	UVHVVR oznaka vzorca	Št. Spremnega dopisa	Datum vzorčenja	Amitraz (mg/kg)	Klorfenvinfos (mg/kg)
25081	019860	05316	04.08.2015	-	<0,01
25082	002454	V06173-sl/2015	05.08.2015	0,11	<0,01
25083	006909	014178	04.08.2015	0,065	<0,01
25084	019190	06353	05.08.2015	-	<0,01
25085	014444	04215B	05.08.2015	-	<0,01
25086	014650	04216B	05.08.2015	0,11	<0,01
25087	010414	009940	05.08.2015	0,19	-
25089	001530	017361	05.08.2015	<0,05	<0,01
25091	001849	10203	05.08.2015	0,18	-
25093	001841	10201	04.08.2015	0,051	<0,01

Tabela 4: Pregled rezultatov študij akutne toksičnosti s klorfenvinfosom

<i>Študija</i>	<i>Vrsta poskusne živali</i>	<i>LD₅₀/LC₅₀</i>	<i>Vir</i>
Akutna peroralna toksičnost	podgana	9,6-23,8 mg/kg tm	JMPR, 1994
	miš	117-200 mg/kg tm	JMPR, 1994
	kunec	300-1000 mg/kg tm	JMPR, 1994
	pes	>12,000 mg/kg tm	JMPR, 1994
	Pes	50,5 mg/kg tm	ATSDR
Akutna dermalna toksičnost	podgana	30-108 mg	JMPR, 1994
	Kunec	412-4,700 mg/kg tm	JMPR, 1994
Akutna inhalacijska toksičnost	Podgana	0,133 mg/L (4 h)	ATSDR, 1997

Slika 1: Možne presnovne poti amitraza (JMPR, 1998)

Figure 1. Proposed metabolic routes for amitraz in crops and animals



Concentration of each metabolite, given as percent of total urinary excretion: *N*-Methyl-*N'*-(2,4-xylyl)formamidine, 4-38% (dose-dependent); 4-acetamido-*meta*-toluic acid plus 4-formamido-*meta*-toluic acid, 32%; form-2',4'-xylylidine, < 2%; 4-amino-*meta*-toluic acid, < 2%

Slika 2: Možne presnovne poti klorfenvinfososa (ATSDR, 1997)

