

# Ocena tveganja za zdravje ljudi zaradi izpostavljenosti ostankom zdravil za uporabo v veterinarski medicini v tinkturah propolisa

*Risk assessment for consumer health from exposure to residues of substances used as  
veterinary medicines in tinctures of bee propolis*

Dr. Urška Blaznik, univ.dipl.kem.

Dr. Tanja Fatur, univ. dipl. mikrobiol.

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

Nacionalni inštitut za javno zdravje, Center za zdravstveno ekologijo, Trubarjeva 2, 1000 Ljubljana

## **Povzetek**

Propolis je naravni proizvod čebel, ki se v obliki tinkture najpogosteje pripravlja z raztapljanjem v vodno etanolni raztopini, lahko pa se ga vmeša tudi v druga topila npr. v vodo ali glicerol. Tinktura propolisa predstavlja koncentriran vir biološko aktivnih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom. Potrošnikom je običajno na voljo v kapalnih stekleničkah, kar omogoča odmerjanje v kapljicah.

Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin je v 2016 izvedla posebni nadzor nad ostanki veterinarskih zdravil in fitofarmaceutskih sredstev v propolisu. Odvzetih je bilo pet vzorcev tinktur propolisa, ki jih je analiziral Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano. V vseh odvzetih vzorcih so bili nad mejo določanja prisotni ostanki amitraza, ostanki kumafosa pa v treh od petih vzorcev. Ugotovljena koncentracija amitraza v odvzetih vzorcih je bila od 1,1 do 2,4 mg/kg tinkture, koncentracija kumafosa pa od 0,47 do 12 mg/kg tinkture. V dveh vzorcih je bila koncentracija kumafosa pod mejo določanja (0,25 mg/kg).

Na Nacionalnem inštitutu za javno zdravje (NIJZ) smo ocenili tveganje za zdravje ljudi zaradi izpostavljenosti ugotovljenim ostankom kemijskih snovi v posameznih vzorcih tinktur propolisa. Ocena tveganja je postopek, na podlagi mednarodno sprejete metodologije, s katerim na neodvisen, znanstveni in transparentni način opredelimo verjetnost, da bo pri določeni izpostavljenosti prišlo do škodljivih posledic za zdravje.

Za amitraz sta bila na podlagi pregleda in ocene dostopnih podatkov določena referenčna odmerka: akutni referenčni odmerek (ARfD) 0,01 mg/kg telesne mase (tm) in sprejemljivi dnevni vnos (ADI) 0,003 mg/kg tm/dan. Zaključili smo, da so trenutno veljavni referenčni odmerki dovolj nizki tudi v zvezi z morebitnim motenjem hormonskega ravnovesja ter vplivi na razmnoževanje in potomstvo. Za kumafos smo pregledali in povzeli javno dostopne študije. Na podlagi teh podatkov smo za karakterizacijo akutnega tveganja uporabili ARfD 0,002 mg/kg tm, za dolgotrajno tveganje pa ADI 0,00025 mg/kg tm/dan.

Pri ocenjevanju izpostavljenosti smo predpostavili, da potrošniki tinkture propolisa uživajo enkrat ali dlje časa (več kot tri mesece), in da si tinkture propolisa odmerjajo v priporočenih odmerkih, ki so glede na sestavo vzorcev tinktur znašali od ene do štirideset kapljic dnevno. Največja enkratna izpostavljenost odraslih ostankom amitraza bi znašala 0,73 % ARfD, kumafosu pa 1,3 % ARfD; največja dolgotrajna izpostavljenost ostankom amitraza 2,4 % ADI, kumafosa pa 20 % ADI. Iz tega sledi, da ugotovljeni ostanki amitraza in kumafosa v propolisu ne predstavljajo tveganja za zdravje odraslih. Pri enem od vzorcev smo ocenili, da bi zaradi izpostavljenosti kumafosu lahko obstajalo tveganje za zdravje malčkov. Ker alkoholne tinkture niso primerne za otroke, je ta scenarij le hipotetičen.

Skladno s temeljnimi načeli varne uporabe podpiramo redno spremljanje ostankov veterinarskih zdravil v živilih. Priporočamo upoštevanje najnovejšega stališča Evropske agencije za varnost hrane (EFSA) glede priporočenih mejnih vrednosti ostankov amitraza in kumafosa v tistih živilih živalskega izvora, ki niso zajeta v Uredbi Komisije (EU) št. 37/2010. Poleg tega priporočamo ozaveščanje potrošnikov o uporabi tinktur propolisa skladno z navodili za uporabo ter ustrezen nadzor nad označevanjem tinktur, tudi glede opozoril o neprimernosti alkoholnih tinktur za otroke.

## Summary

Propolis is a natural bee-honey product, most commonly prepared in the form of tinctures by dissolving it in water-ethanol solutions. It may also be extracted by other solvents, such as water or glycerol. Propolis tincture represents a concentrated source of biologically active substances with a nutritional or physiological effect. To the consumers it is usually available in the drop dispensing bottles, allowing dosing in drops.

In 2016, the Administration of the Republic of Slovenia for Food Safety, Veterinary and Plant Protection conducted a special control over the use and residues of veterinary drugs and plant protection products in propolis. Five samples of propolis tinctures were taken and analyzed by the National Laboratory for Health, Environment and Food. The residues of amitraz were above the limit of quantification in all samples, the residues of coumaphos in three. The amitraz concentrations of amitraz ranged from 1.1 to 2.4 mg per kg tincture, those of coumaphos ranged from 0.47 to 12 mg/kg tincture. In two samples, the concentrations of coumaphos were below the limit of quantification (0.25 mg/kg).

The National Institute of Public Health (NIJZ) assessed risk for human health due to exposure to the identified chemicals in the individual samples of propolis tinctures. Risk assessment is an independent, scientific and transparent process by which the likelihood of harmful effects to health as a consequence of a particular exposure is characterised applying the international recognised risk assessment procedures. Based on the review and the assessment of the available data the acute reference dose (ARfD) of 0.01 mg /kg body weight (bw) and the acceptable daily intake (ADI) of 0,003mg /kg bw/day for amitraz were determined. We concluded that the current reference values are low enough also concerning the potential endocrine disrupting properties as well as reproductive and developmental effects of amitraz. We studied and summarized the publicly available data on coumaphos. Based on these, we applied the ARfD 0,002 mg/kg bw in acute risk characterisation, and ADI 0.00025 mg/kg bw/day in chronic.

In exposure assessment we assumed that propolis tinctures were consumed on one occasion or for long periods (over three months), and at the recommended doses which ranged from one to forty drops, depending on the composition of sampled tinctures. The highest acute exposure of adults to amitraz would be 0.73 % ARfD, to coumaphos 1.3 % ARfD; the highest chronic exposure to amitraz residues 2.4 % ADI, to coumaphos 20 % ADI. It follows that the identified residues of amitraz and coumaphos in propolis do not pose a risk to health of adults. In one of the samples we assessed that exposure to coumaphos may pose risk to health of toddlers. However, this scenario is nearly hypothetical in view of the fact that alcoholic tinctures are not suitable for children.

In accordance with the fundamental principles of safe use of veterinary medicines, we support regular residue monitoring in foods. We recommend bringing into practice the latest opinion of the European Food Safety Authority (EFSA) concerning recommended maximum residue levels of amitraz and coumaphos in those foodstuffs of animal origin that are not covered by the Commission Regulation (EU) No. 37/2010. In addition, we recommend raising consumer awareness on the use of tinctures of propolis in accordance with the instructions for use and a proper control on labeling of tinctures, as well as on warnings concerning the unsuitability of alcoholic tinctures for children.

## Kazalo

Povzetek.....	2
Summary .....	3
1 Uvod .....	7
1.1 Ozadje.....	7
1.2 Propolis.....	7
1.3 Rezultati laboratorijskih analiz.....	7
1.4 Zakonodaja .....	8
2 Ocena tveganja.....	9
2.1 Ocena nevarnosti .....	9
2.1.1 Amitraz .....	9
2.1.1.1 Fizikalno kemijske lastnosti.....	9
2.1.1.2. Mehanizem delovanja .....	10
2.1.1.3 Absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje pri sesalcih .....	10
2.1.1.4 Strupenost .....	10
2.1.1.4.1 Lokalni učinki .....	11
2.1.1.4.2 Akutna strupenost.....	11
2.1.1.4.3 Genotoksičnost .....	11
2.1.1.4.4 Kronična strupenost.....	12
2.1.1.4.4.1 Učinki pri študijah ponavljajoče se izpostavljenosti in študijah rakotvornosti .....	12
2.1.1.4.4.2 Učinki na endokrini (hormonski) sistem .....	12
2.1.1.4.4.3 Učinki na imunski sistem .....	12
2.1.1.4.4.4 Učinki na živčni sistem .....	13
2.1.1.4.5 Učinki na razmnoževanje in potomstvo .....	13
2.1.1.4.6 Strupenost metabolita N-2,4-dimetilfenil-N-metilformamidina .....	14
2.1.1.4.7 Razvrstitev.....	14
2.1.1.4.8 Kritični odmerek in referenčni (varni) odmerki .....	14
2.1.2 Kumafos .....	15
2.1.2.1 Fizikalno kemijske lastnosti.....	15
2.1.2.2 Mehanizem delovanja .....	15
2.1.2.3 Absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje pri sesalcih .....	15
2.1.2.3.1 Interakcije z drugimi kemikalijami.....	16
2.1.2.4 Strupenost .....	16
2.1.2.4.2 Akutna strupenost.....	16
2.1.2.4.3 Genotoksičnost .....	16
2.1.2.4.4 Kronična strupenost.....	17
2.1.2.4.4.1 Učinki pri študijah ponavljajoče se izpostavljenosti in študijah rakotvornosti .....	17

2.1.2.4.4.2	Učinki na endokrini (hormonski) sistem.....	20
2.1.2.4.4.3	Učinki na imunski sistem.....	20
2.1.2.4.4.4	Učinki na živčni sistem.....	20
2.1.2.4.5	Učinki na razmnoževanje in potomstvo .....	21
2.1.2.4.6	Razvrstitev kumafosa .....	22
2.1.2.4.7	Kritični odmerek in referenčni (varni) odmerki .....	23
2.2	Ocena izpostavljenosti.....	26
2.2.1	Izpostavljenost amitrazu preko vzorcev tinkture propolisa.....	27
2.2.1.1	Vzorec tinkture propolisa OT-1 .....	27
2.2.1.2	Vzorec tinkture propolisa OT-2.....	28
2.2.1.3	Vzorec tinkture propolisa OT-3.....	28
2.2.1.4	Vzorec tinkture propolisa OT-4.....	28
2.2.1.5	Vzorec tinkture propolisa OT-5.....	28
2.2.2	Izpostavljenost kumafosu preko vzorcev tinkture propolisa .....	29
2.2.2.1	Vzorec tinkture propolisa OT-1 .....	29
2.2.2.2	Vzorec tinkture propolisa OT-2.....	29
2.2.2.3	Vzorec tinkture propolisa OT-3.....	29
2.2.2.4	Vzorec tinkture propolisa OT-4.....	29
2.2.2.5	Vzorec tinkture propolisa OT-5.....	30
2.3	Opredelitev tveganja.....	30
2.3.1	Opredelitev tveganja glede ostankov amitraza v odvzetih vzorcih tinktur propolisa.....	30
2.3.1.1	Vzorec tinkture propolisa OT-1 .....	30
2.3.1.2	Vzorec tinkture propolisa OT-2.....	31
2.3.1.3	Vzorec tinkture propolisa OT-3.....	31
2.3.1.4	Vzorec tinkture propolisa OT- 4.....	31
2.3.1.5	Vzorec tinkture propolisa OT-5.....	32
2.3.2	Opredelitev tveganja glede ostankov kumafosa v odvzetih vzorcih tinktur propolisa .....	32
2.3.2.1	Vzorec tinkture propolisa OT-1 .....	32
2.3.2.2	Vzorec tinkture propolisa OT-2.....	32
2.3.2.3	Vzorec tinkture propolisa OT-3.....	33
2.3.2.4	Vzorec tinkture propolisa OT- 4.....	33
2.3.2.5	Vzorec tinkture propolisa OT-5.....	33
2.3.3	Opredelitev tveganja glede zmesi amitraza in kumafosa v vzorcih tinktur propolisa .....	36
3	Ovrednotenje ocene tveganja.....	37
3.1	Negotovosti .....	37
4	Zaključki in priporočila .....	37
5	Viri.....	38

## **Seznam okrajšav**

5HT – 5 hidroksi triptamin  
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 varnost hrane  
EMA – Evropska agencija za zdravila  
EU – Evropska unija  
HGPR1 – Hipoksantin-gvanin fofsforibozil transferaza  
IC – inhibitorna koncentracija  
IM – interna metoda  
LC-MS/MS – tekočinska kromatografija z masnim detektorjem  
LD<sub>50</sub> – 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  
LOQ – meja določanja  
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, okolje in hrano  
PG – prostaglandin  
pKa – disociacijska konstanta  
ppm – delov na milijon  
tm – telesna masa  
SIST EN – standard Slovenskega inštituta za standardizacijo  
UVHVVR – Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin

## **1 Uvod**

### **1.1 Ozadje**

Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) je v 2016 izvedla posebni nadzor nad uporabo veterinarskih zdravil in pesticidov v propolisu. Njihove ostanke je v odvzetih petih vzorcih tinktur propolisa določil Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano. Skladno z zaprosilom UVHVVR je Nacionalni inštitut za javno zdravje je ocenil tveganje za zdravje ljudi zaradi izpostavljenosti ugotovljenim ostankom zdravil za uporabo v veterinarski medicini v posameznih vzorcih propolisa.

### **1.2 Propolis**

Propolis ali zadelavina se postrga z delov panja in se za uživanje v obliki tinkture najpogosteje pripravlja z raztapljanjem v etanolni raztopini, lahko pa se ga vmeša tudi v druga ekstrakcijska topila, npr. vodo ali glicerol. Z namakanjem v etanolni raztopini ekstrahiramo več biološko aktivnih snovi, ki so sicer lipofilne (polifenoli, flavonoidi). Nekatera ekstrakcijska topila zaradi strupenosti tudi niso primerna za uporabo, npr. metanol (Samec, 2014).

V nadaljevanju se termin »propolis« nanaša na odvzete etanolne oz. vodno-etanolne izvlečke propolisa. Izključno za te smo ocenjevali tveganje za zdravje zaradi ostankov zdravil za veterinarsko uporabo. Ocena ni relevantna za vzorce pripravljene na osnovi drugih ekstrakcijskih topil, pri katerih bi bila vsebnost aktivnih snovi lahko povsem drugačna.

### **1.3 Rezultati laboratorijskih analiz**

Odvzetih in analiziranih je bilo pet vzorcev propolisa. Analize so bile opravljene v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH). Vzorca so bili preiskani na 92 ostankov veterinarskih zdravil in pesticidov. Za amitraz in njegove metabolite je NLZOH uporabil interno analizo metodo IM/LC-MS-MS, Mb, za kumafos in ostale ostanke pa analizo metodo SIST EN 15662 (NLZOH, 2016 a-e).

Amitraz je bil nad mejo določanja ugotovljen v vseh petih odvzetih vzorcih propolisa, kumafos pa v treh od petih vzorcev propolisa (Tabela 1). Ostali ostanki veterinarskih zdravil, pesticidov in njihovih metabolitov so bili vsebovani pod mejo določanja (< LOQ), ki je bila 0,25 mg/kg.

Meja določanja (LOQ) je najnižja koncentracija analita, ki jo laboratorij določi z vsemi parametri analitske metode (natančnost, pravilnost). Običajno je najnižja točka večnivojske umeritvene krivulje. Matriks (ozadje) vzorca vpliva na kvantifikacijo pesticidov, zato mora biti primerno vrednoten v validacijskih študijah preskusne metode (European Commission, 2013).

Tabela 1. Osnovni podatki o odvzetih vzorcih propolisa ter rezultati analiz (NLZOH, 2016 a-e)

Kodna št. vrečke	Datum odvzema vzorca	Rezultat
<b>4067</b>	12.2.2016	Amitraz: 1.1 mg/kg; Kumafos: < 0,25 mg/kg
<b>10902943</b>	15.2.2016	Amitraz: 2.2 mg/kg; Kumafos: < 0,25 mg/kg
<b>10925171</b>	15.2.2016	Amitraz: 2.4 mg/kg; Kumafos: 12 mg/kg
<b>20902</b>	16.2.2016	Amitraz: 2 mg/kg; Kumafos: 0,47 mg/kg
<b>10717899</b>	17.2.2016	Amitraz: 2.1 mg/kg; Kumafos: 3 mg/kg

#### 1.4 Zakonodaja

Mejno vrednost ostankov (MVO) zdravil za uporabo v veterinarski medicini v živilih živalskega izvora predpisuje Uredba Komisije (EU) št. 37/2010 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora, vendar propolis ni prepoznan kot ciljno tkivo oziroma proizvod, v katerem se nadzoruje uporaba veterinarskih zdravil. MVO aktivnih snovi, ki so dovoljene za uporabo v pripravkih za zdravljenje čebel so določene le za med. MVO za amitraz, znaša 0,2 mg/kg medu. MVO za kumafos pa znaša 0,1 mg/kg medu.

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.

V skladu z Uredbo Evropske unije št. 396/2005 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 EU kot tudi pri Evropski agenciji za varnost hrane (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 MVO. Če ob predlagani uporabi nižje MVO ni možno doseči, se snov ne sme uporabljati na tej vrsti rastlin ali živali.



Predpisana MVO mora biti tako nizka, da niti izpostavljenost isti snovi iz več živil hkrati ni 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.

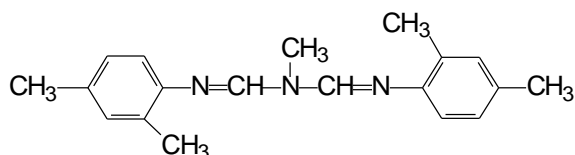
## 2 Ocena tveganja

### 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<sup>1</sup>

##### 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, z molekulsko maso 293,4 g/mol in kemijsko formulo C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>. V vodi je slabo topen, dobro se topi v organskih topilih. Disociacijska konstanta (pK<sub>a</sub>) 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<sub>ow</sub>) 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).

---

<sup>1</sup> Ocena nevarnosti za amitraz je povzeta in nekoliko dopolnjena ocena nevarnosti narejena za potrebe Ocene tveganja za zdravje potrošnikov zaradi izpostavljenosti ostankom zdravil za uporabo v veterinarski medicini v medu in satju (Fatur in sod., 2016).

#### 2.1.1.2. Mehanizem delovanja

Amitraz je agonist adrenergičnih receptorjev  $\alpha 1$  ( $ED_{50}$  10 nM) in  $\alpha 2$  ( $ED_{50}$  130 nM), antagonist H1 ( $IC_{50}$  10  $\mu$ 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  $\alpha 2$ . 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. 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 varnost hrane (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 testnimi smernicami.

#### 2.1.1.4.1 Lokalni učinki

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

#### 2.1.1.4.2 Akutna strupenost

Smrtni odmerek za 50% poskusnih živali (LD<sub>50</sub>) znaša pri zaužitju 600 mg/kg telesne mase (tm). LD<sub>50</sub> 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 NOAEL<sup>2</sup> 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 tlaka, 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 miši (JMPR 1998). Te rezultate je upoštevala EFSA pri postopku vključevanja amitraza na seznam dovoljenih aktivnih snovi v sredstvih za zaščito rastlin v EU in ocenila, da lahko smatra, da amitraz ni genotoksičen (EFSA, 2003).

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

---

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

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 B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 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 spontanih tumorjev (JMPR, 1998). Zato rezultati teh raziskav niso relevantni za sklepanje o rakotvornosti amitraza za ljudi. US EPA (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 (US EPA, 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  $\alpha_2$ . Prek aktivacije receptorjev  $\alpha_2$  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 odmerek 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  $\alpha_2$ . 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 E<sub>2</sub> in antagonizma histaminskih receptorjev H<sub>1</sub>, amitraz deluje protivnetno. Preko imunskih celic lahko deluje imunotoksično in lahko povzroča kontaktno preobčutljivost, ki nastopi s časovnim zamikom. LOEL<sup>3</sup> znaša 26,5 mg/kg tm/dan (Institoris in sod.,

---

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

2007), vendar podatkov, ali 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 mase 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 o 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 ješčče, 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 tm/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 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 vplivu amitraza na razvoj osrednjega živčevja. Izpostavljenost brejih samic odmerku 20 mg/kg tm/dan je povzročila dolgotrajne spremembe 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. V študiji so uporabili samo en testni odmerek, zato ta študija ne omogoča določitve NOAEL.



#### 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 (ES) št. 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)<sup>4</sup> 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.

Po predlogu EFSA (2003) znaša sprejemljivi dnevni vnos (ADI)<sup>5</sup> 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) oziroma odmerki, pri katerem so bili ugotovljeni škodljivi vplivi na razvoj osrednjega živčevja – glej točko 2.1.1.4.5). Zato lahko na podlagi preučenih 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 opravljene študije o vplivih na razvoj***

---

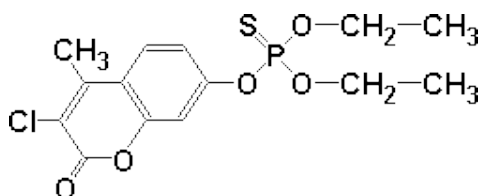
<sup>4</sup> ARfD - Akutni referenčni odmerek je odmerek, ki smo mu lahko izpostavljeni enkratno oz. v krajšem časovnem obdobju (do 14 dni) in ki, na podlagi vseh znanih podatkov, ne predstavlja tveganja za zdravje.

<sup>5</sup> 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.

osrednjega živčevja, pri kateri NOAEL ni možno določiti zaradi izpostavljenosti samo enemu testsnemu odmerku.

## 2.1.2 Kumafos

### 2.1.2.1 Fizikalno kemijske lastnosti



Kumafos (CAS št. 56-72-4) s kemijskim imenom O-(3-kloro-4-metil-2-okso-2H-1-benzopiran-7-il) O,O-dietil fosforotioat, z molekulsko maso 362,77 g/mol in kemijsko formulo  $C_{14}H_{16}ClO_5PS$  je organofosforni insekticid, v EU dovoljen za uporabo kot veterinarsko zdravilo. Za kmetijsko uporabo ni odobren.

### 2.1.2.2 Mehanizem delovanja

Kumafos sodi med organofosforne insekticide. Ker je kemijsko fosforotioat je za njegovo aktivnost najprej potrebna aktivacija v jetrih. V aktivirani obliki je inhibitor encima acetilholinesteraze (Temple in Smith, 1989-1999). Acetilholinesteraza (AChE) je encim, ki razgrajuje živčni prenašalec acetilholin. Posledica inhibicije AChE 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, solzenje 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 tlak. 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 organofosfornimi substancami je prenehanje dihanja (Fatur in sod., 2016).

### 2.1.2.3 Absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje pri sesalcih

Kumafos se dobro absorbira skozi prebavila, dihala in kožo, čeprav je absorpcija skozi kožo počasna. V veliki meri se presnovi z oksidacijo in s hidrolizo. Glavni metaboliti so O,O - dietiltiofosforna kislina, fosforna kislina, dietilfosforna kislina, desetilkumafos in klorferon. Pri podganah se večina, to je do 80%, zaužitega odmerka, izloči v urinu v do 7 dneh, manjši delež se izloči z blatom. V organizmih se ne kopiči (HSDB, 1986-2015; Temple in Smith, 1989-1999).

#### 2.1.2.3.1 Interakcije z drugimi kemikalijami

Snovi z inhibitornim potencialom za AChE, kot npr. drugi organofosforni in karbamatni insekticidi lahko povečajo strupenost kumafosa (HSDB, 1986-2015). Snovi, ki inducirajo encimski sistem CYP P450, lahko zaradi indukcije metabolnih encimov pospešijo aktivacijo kumafosa in povečajo njegovo strupenost, vendar istočasno pospešijo njegovo presnovo in tako zmanjšajo njegovo strupenost. Snovi, ki zavrejo presnovne encime, lahko na ta način zmanjšajo obseg aktivacije kumafosa iz tio v okso obliko ter tako zmanjšajo njegovo strupenost, po drugi strani pa lahko podaljšajo razpolovni čas kumafosa in posledično povečajo njegovo strupenost. (Timbrell, 1995; Marrs, 1995).

Na seznamu snovi, ki inducirajo encimski sistem CYP P450 so številne učinkovine zdravil (npr. acetil salicilna kislina, morfin, fenitoin, karbamazepin, omeprazol, inzulin, steroidni hormoni), psihotropne spojine (amfetamin, etanol, nikotin), sestavine ali onesnaževala v živilih (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 (Fatur in sod., 2016).

#### 2.1.2.4 Strupenost

##### 2.1.2.4.1 Lokalni učinki

Kumafos rahlo draži kožo in oči. Ne povzroča preobčutljivosti v stiku s kožo (EPA, 1996).

##### 2.1.2.4.2 Akutna strupenost

S kumafosom so bile izvedene številne študije akutne strupenosti po oralnem in dermalnem vnosu, ter po vdihavanju. Kumafos je oralno toksičen. Najnižja oralna LD<sub>50</sub> o kateri poročajo pri podganah je 13 mg/kg tm/dan, pri miših pa 28 mg/kg tm (JMPR, 1968). Samice podgan so precej bolj občuljive kot samci. Po eni uri vdihavanja kumafosa je bil določen LC<sub>50</sub> 341 mg/m<sup>3</sup>. Akutna dermalna toksičnost kumafosa je nizka, saj je bila na kuncu določena LD<sub>50</sub> večja od 2400 mg/kg tm (EPA, 1989).

##### 2.1.2.4.3 Genotoksičnost

V številnih *in vitro* študijah niso zaznali genotoksičnega delovanja kumafosa, ne v prisotnosti, niti v odsotnosti zunanega metabolnega sistema. Negativne rezultate so zabeležili v študijah povratnih mutacij v bakterijah (*Salmonella typhimurium* in *Escherichia coli*), študiji genskih mutacij v celicah mišjega limfoma, študijah pojava kromosomskih aberacij in izmenjave sestrskih kromatid v ovarijskih celicah kitajskega hrčka (CHO) in v študiji neplanirane sinteze DNK v primarnih podganjih hepatocitih. V *in vitro* študiji, kjer so genotoksičnost kumafosa opazovali kot mutacije v lokusu HGPRT celic CHO, so opazili povečano pojavljanje mutacij v prisotnosti sistema za metabolno aktivacijo, ne pa v primeru, ko sistem za metabolno aktivacijo ni bil prisoten. V testu določanja mutacij v celicah V79 (pljučni fibroblasti kitajskega hrčka) kumafos ni povzročil povišanja števila mutacij, ne v prisotnosti, ne v odsotnosti metabolnega sistema.



Genotoksično delovanje kumafosa so določali tudi v dveh *in vivo* študijah na miših. V nobeni niso opazili povišanja števila nastalih mikrojedr po izpostavitvi kumafosu (EMEA, 2001).

Upoštevajoč rezultate *in vitro* in *in vivo* študij genotoksičnosti, so strokovnjaki Evropske agencije za zdravila (EMA iz angl. *European Medicines Agency*) zaključili, da kumafos ne deluje genotoksično.

Ameriška agencija za varstvo okolja (US EPA) v svoji oceni kumafosa navaja, da kumafos ni povzročil povratnih mutacij v Amesovem testu ali poškodb DNK v testu neposrednih poškodb DNK in njihovega popravljanja v *E. coli*. Hkrati komentirajo pomanjkljivosti predložene študije pojava mikrojedr na miših. Uporabljen je bil le en odmerek in pri tem niso opazili nobenih učinkov toksičnega delovanja in zato obstaja skrb, da ciljno tkivo ni bilo izpostavljeno testni snovi (US EPA, 1996).

#### 2.1.2.4.4 Kronična strupenost

##### 2.1.2.4.4.1 Učinki pri študijah ponavljajoče se izpostavljenosti in študijah rakotvornosti

S kumafosom je bilo izvedenih več študij subakutne in subkronične toksičnosti, kronične toksičnosti in rakotvornosti na podganah, psih in na miših. Na voljo so le skopi povzetki študij, ne pa celotne študije, ki bi omogočile neodvisno oceno.

V študijah ponavljajoče se izpostavljenosti kumafosu je bil kritični učinek inhibicija AChE. To so izmerili pri podganah, ki so prejemale kumafos s hrano 16 tednov, pri podganah, ki so dobile intraperitonealne injekcije kumafosa 60 dni zapored in pri podganah, ki so prejemale kumafos v mleku v obdobju 90 dni. Znižana aktivnost AChE je bila tudi kritični učinek kumafosa, ki so ga opazili pri psih, ki so bili 12 tednov izpostavljeni kumafosu v hrani. V tej študiji so določili NOAEL 0,05 mg/kg tm/dan, saj so pri višjem odmerku po enem do dveh tednih opazili znižano aktivnost serumske AChE (JMPR, 1968). Na psih je bila izvedena še ena študija, v kateri so psi 90 dni z mlekom prejeli 0, 10, 25 in 100 ppm kumafosa, kar je enako 0; 0,25; 1,25 in 2,5 mg/kg tm/dan. Po dveh tednih uživanja 0,25 mg/kg tm kumafosa so izmerili znižanje serumske AChE za več kot 50 % (JMPR, 1968).

Podgane so 13 tednov v krmi prejemale kumafos v odmerkih 0; 0,1; 0,25 in 0,5 mg/kg tm/dan. Od odmerka odvisno inhibicijo eritrocitne AChE so opazili pri obeh spolih in v vseh skupinah živali, ki so prejemale kumafos. Inhibicijo plazemske AChE so izmerili pri 0,5 mg/kg tm/dan, medtem ko možganska AChE ni bila inhibirana (EMEA, 2001).

Študija ponavljajoče se izpostavljenosti kumafosu je bila opravljena na psih, ki so eno leto v krmi prejeli 0; 0,025; 0,75 in 2,25 mg/kg tm/dan. V vseh skupinah živali, izpostavljenih kumafosu, in pri obeh spolih, so izmerili od odmerka odvisno znižanje eritrocitne in plazemske AChE. Inhibicijo možganske AChE so zaznali le pri živalih, ki so prejemale najvišji odmerek kumafosa. V študiji je bil določen NOAEL 0,025 mg/kg tm/dan zaradi inhibicije eritrocitne AChE pri 0,75 mg/kg tm/dan (EMEA, 2001).

Še ena enoletna študija je bila izvedena na psih, ki so v krmi dnevno dobivali kumafos v odmerkih 0; 0,05; 0,25 in 1,25 mg/kg tm. Inhibicijo serumske AChE so izmerili pri psih, ki so uživali 1,25 mg/kg tm/dan, eritrocitne AChE pa pri psih, ki so prejeli 0,25 in 1,25 mg/kg tm/dan. Ob koncu študije so živali usmrtili in izmerili znižanje možganske in jetrne AChE pri 1,25 mg/kg tm/dan in jetrne AChE pri

0,25 mg/kg tm/dan. V študiji je bil določen NOAEL 0,05 mg/kg tm/dan zaradi inhibicije serumske AChE opažene pri 0,25 mg/kg tm/dan (JMPR, 1968).

Prva študija kronične strupenosti kumafosa je bila izvedena na podganah. Le-te so prejemale 0, 5, 10, 25 ali 100 ppm kumafosa v hrani v obdobju dveh let. Izpostavljenost 100 in 25 ppm kumafosa je skrajšala povprečno življenjsko dobo izpostavljenih živali. V skupini izpostavljeni 100 ppm kumafosa so občasno opazili povečano razdražljivost in vznemirjenost živali. Inhibirana aktivnost serumske in eritrocitne AChE je bila izmerjena pri živalih izpostavljenih 10 ppm in več. Pri živalih, ki so prejemale 10 ppm kumafosa in več so tudi opazili znižano težo ledvic in ta učinek so delno pripisali izpostavljenosti kumafosu. Histopatoloških sprememb pri obdukciji niso opazili. V študiji je bil določen NOAEL 5 ppm, kar je ob upoštevanju vnaprej določenih vrednosti za pretvorbo vnosa s hrano v mg/kg tm/dan, 0,33 mg/kg tm/dan. V tej študiji ne poročajo o vplivu kumafosa na razvoj novotvorb (JMPR, 1968)

V prvi študiji rakotvornosti so podgane F-344 dve leti hranili s krmo, ki je vsebovala 10 in 20 ppm kumafosa, kar je enako povprečnemu vnosu 0,5 in 1 mg/kg tm/dan. Pri samcih niso opazili povečanega pojavljanja tumorjev. Delež samcev pri katerih so opazili tumorje je bil 28 % v kontrolni skupini, 24 % v skupini izpostavljeni nizkemu odmerku in 32 % pri skupini izpostavljen visokemu odmerku. Nasprotno so pri samicah opazili od odmerka odvisno povečano pojavljanje tumorjev. V kontrolni skupini so tumorje opazili pri 12 % samic, pri nizkem odmerku pri 20 % in pri visokem odmerku pri 26 % živali. Delež samic z malignimi tvorbami je bil predvsem posledica povečanega pojavljanja levkemije pri samicah. To so določili v 9 % samic kontrolne skupine, 15 % samic skupine, ki je prejemale 0,5 mg/kg tm/dan kumafosa in 22 % samic, ki so prejemale 1 mg/kg tm/dan. Levkemija je sicer zelo pogosto prisotna v starejših podganah seva F-344, zato opaženo povečano pojavljanje levkemij ni nujno relevantno za človeka. Poleg tega je bilo v študiji premalo živali vključenih v kontrolno skupino, kar je lahko vplivalo na izid študije, uporabljena sta bila le dva odmerka kumafosa, namesto trije, in študija ni bila izvedena v skladu z določili dobre laboratorijske prakse (GLP) (EMEA, 2001).

V drugi študiji na podganah, so uporabili vrsto podgan bor:WISW, ki niso nagnjene k pojavu levkemije v višji starosti. Podgane so dve leti prejemale 0, 1, 5 in 25 ppm kumafosa, kar je bilo enako povprečnemu vnosu 0; 0,05; 0,25 in 1,25 mg/kg tm/dan za samce in 0; 0,07, 0,36 in 1,70 mg/kg tm/dan za samice. Pri samicah, ki so prejemale 25 ppm kumafosa je bil znižan vnos hrane in vode, ter posledično telesna masa v primerjavi s kontrolno skupino. Izpostavljenost kumafosu ni vplivala na smrtnost živali ali na pojav kliničnih znakov. Oftalmološki pregled ni pokazal sprememb pri živalih izpostavljenih kumafosu. Pri odmerku 25 ppm so izmerili znižano aktivnost plazemske AChE, 27-34 % pri samcih in 45-53 % pri samicah. Pri tem odmerku je bila znižana tudi aktivnost eritrocitne AChE pri obeh spolih, 16-28 % pri samcih in 18-34 % pri samicah. Občasno so izmerili rahlo znižano aktivnost tudi pri živalih, ki so prejemale 5 ppm kumafosa. Po 53 tednih prejetja 25 ppm kumafosa, ne pa tudi po 104 tednih, torej ob koncu študije, so pri samicah izmerili povečano aktivnost možganske AChE (15-42 %), pri samcih pa ob koncu študije (23-43 %). Pri nobenem odmerku niso opazili povečanega pojavljanja tumorjev. Študije je bila izvedena v skladu s smernico in določili GLP. V študiji je bil določen NOAEL 0,25 mg/kg tm/dan (EMEA, 2001, JMPR, 1990).

Na podlagi rezultatov obeh študij so na Evropski agenciji za zdravila zaključili, da kumafos ne povzroča raka pri podganah.

Dvoletna študija rakotvornosti je bila izvedena tudi na miših B6C3F1, ki so prejemale 0, 10 in 20 ppm kumafosa v hrani, kar je enako povprečnemu dnevnu vnosu 0, 1 in 2 mg/kg tm. Klinične znake so začeli opazovati po enem letu pri samcih in samicah. Pri samcih se je povečala smrtnost pred koncem študije. Pri samicah, ki so prejemale 2 mg/kg tm/dan kumafosa so opazili od odmerka odvisno, a ne statistično značilno, povečano pojavljanje malignih tumorjev. V kontrolni skupini so opazili maligne tumorje pri 20 % živali, v skupini, ki je prejela 1 mg/kg tm/dan pri 26 % in v skupini, ki je dobivala 2 mg/kg tm/dan pri 36 % samic. Pojavili so se hepatocelularni karcinomi (kontrolna skupina 0 %, 10 ppm 8 %, 20 ppm 10 %) in karcinomi/adenokarcinomi dojke (kontrolna skupina 0 %, 10 ppm 2 %, 20 ppm 4 %). Glede na podatke v strokovni literaturi je bilo pojavljanje obeh vrst tumorjev višje kot je ponavadi pri miših B6C3F1. Poleg tega so se pri samicah pojavili tudi alveolarni/bronhialni adenomi in sicer pri 8 % živali, izpostavljenih 1 in 2 mg/kg tm/dan, medtem ko v kontrolni skupini te vrste novotvorb niso ugotovili. Pojav alveolarnih/bronhialnih adenomov ni bil odvisen od odmerka in povišanja tumorjev niso opazili pri samcih miši, a kljub temu je EMEA zaključila, da ni moč izključiti rakotvornega delovanja kumafosa. V študiji ni bil določen NOAEL, saj so učinke izpostavljenosti kumafosu opazili pri obeh odmerkih (EMEA, 1999).

Kumafos je torej mogoče rakotvoren za samice miši. Glede na to, da ni genotoksičen, predvidoma obstaja prag za pojav tumorjev (EMEA, 1999). Nadaljne raziskave rakotvornosti na miših niso bile izvedene, zato dejansko ne vemo kolikšen je prag za pojav tumorjev.

Ameriška agencija za varstvo okolja je kumafos uvrstila v skupino E, torej med snovi za katere obstajajo dokazi, da niso rakotvorne za ljudi. To so snovi za katere ni dokaza o rakotvornosti v vsaj dveh dovolj kakovostnih študijah na različnih vrstah ali v epidemioloških študijah in študijah na živalih (US EPA, 1996). Mednarodna agencija za raziskave raka kumafosa ni obravnavala in ga zato tudi ni uvrstila v nobeno od kategorij rakotvornosti.

Ali izpostavljenost kumafosu povzroča raka pri ljudeh, so ugotavljali tudi v nekaj epidemioloških študijah.

Vpliv izpostavljenosti kumafosu na pojav raka med uporabniki kmetijskih pesticidov so ugotavljali v ZDA v sklopu Agricultural Health Study. Pri moških, katerih sorodniki so zboleli za rakom prostate, so ugotovili povečano tveganje za pojav raka prostate (razmerje obetov 2.17) v primerjavi z moškimi, ki nikoli niso bili izpostavljeni kumafosu. Pri uporabnikih kumafosa, katerih sorodniki niso zboleli za rakom prostate niso ugotovili povečanega tveganja za razvoj raka prostate. Povezavo med družinsko obremenjenimi moškimi z rakom prostate in povečanim obolenjem za to vrsto raka so prvotno ugotovili v obdobju 1993-1999, enake izsledke so ugotovili v letih 2000-2005 in za obdobje 1993-2005. Dobra stran študije je, da je v njej sodelovalo veliko prostovoljcev in ima zato večjo moč. Slaba stran je ta, da so ljudje sami presojali o izpostavljenosti kumafosu v preteklosti, kar lahko vpliva na izračunano razmerje obetov. Poleg tega je tudi poročanje o raku prostate pri sorodnikih v prvem kolenu lahko neresnično.

V študiji niso ugotovili povezave med izpostavljenostjo kumafosu (po poročanju udeležencev) in skupnim pojavom rakavih obolenj, rakom prostate, pljuč, kolorektalnemu rakom ali rakom limfnega in krvotvornega sistema (Christensen s sod., 2010).

V Nebraski so ugotavljali povezavo med izpostavljenostjo pesticidom, uporabljanih v kmetijstvu in živinoreji, in pojavom glioma. V študijo so vključili 251 ljudi, ki so med leti 1988 in 1993 zboleli zaradi glioma, in 498 zdravih ljudi. Vprašalnike o izpostavljenosti pesticidom so v 76 % namesto obolelih izpolnili drugi (partnerji ali sorodniki v prvem kolenu). V študiji so ugotovili povečano tveganje za pojav glioma pri moških, ki so uporabljali kumafos. Razmerje obetov je bilo v tem primeru 5,9. Slabost študije je v tem, da je le majhno število ljudi uporabljalo kumafos in da so o izpostavljenosti posameznim pesticidom poročali svojci in ne tisti, ki so jih dejansko uporabljali (Lee s sod., 2005).

V raziskavi kjer so združili rezultate treh epidemioloških študij s kontrolno skupino so ugotavljali povezanost pojava ne- Hodgkinovega limfoma in uporabo pesticidov v srednjehodnih državah ZDA. Tveganje za pojava ne- Hodgkinovega limfoma je bilo povišano pri uporabnikih kumafosa (razmerje obetov 2.4).

Epidemiološke študije so torej pokazale, da obstaja povezava med izpostavljenostjo kumafosu in pojavom posameznih vrst raka, vendar izpostavljenosti kumafosu in pojava posamezne vrste raka ni možno vzročno povezati na podlagi razpoložljivih podatkov. V epidemioloških študijah je poročanje o izpostavljenosti retrospektivno in pogosto so ljudje izpostavljeni večjemu številu pesticidov in ne le enemu, torej je posamezni učinek težko pripisati izpostavljenosti eni sami kemikaliji.

#### 2.1.2.4.4.2 Učinki na endokrini (hormonski) sistem

V kronični študiji na miših so opazili povečano pojavljanje karcinomov/adenokarcinomov dojke pri odmerku 1 mg/kg tm/dan in več. Podatkov o mehanizmu nastanka teh vrst tumorjev nimamo in zato ne moremo trditi, da je učinek hormonsko pogojen.

#### 2.1.2.4.4.3 Učinki na imunski sistem

O vplivu kumafosa na imunski sistem ne poročajo v nobeni od študij. V kronični študiji na podganah F-344 so opazili povišano pojavljanje levkemij pri samicah, a obstajajo dvomi o relevantnosti tega učinka pri ljudeh zaradi visoke pojavnosti spontanih levkemij pri tej vrsti podgan (EMEA, 2001).

#### 2.1.2.4.4.4 Učinki na živčni sistem

Na kokoših (nesnice Leghorn) so bile izvedene študije zakasnele nevrotoksičnosti. Skupine kokoši, ki so vključevale eno do osem živali so prejele enkratni odmerek kumafosa v želatinasti kapsuli (50 ali 100 mg/kg tm/dan) ali 90 dni zapored po 5 ali 10 mg/g tm/dan kumafosa v kapsuli. Ostalim kokošim so na kožo vratu nanесли enkratni odmerek kumafosa raztopljenega v acetonu (50, 100 ali 500 mg/kg tm) ali dnevno, 30 oz. 90 dni zapored, 100 mg/kg tm kumafosa.

Vse živali, ki so oralno prejele kumafos so kazale holinergični sindrom, kljub prejetemu atropina. Pri kokoših, ki so jim kumafos nanесли na kožo holinergičnega sindroma niso zaznali. Vse živali, ki so preživele po zaužitju kumafosa in tiste, ki so kumafosu bile izpostavljene dermalno, so kazale klinične znake zakasnele nevropatije. Učinki so bili odvisni od odmerka. Po enem ali več oralnih ali dermalnih odmerkov 50 mg/kg tm so zaznali ataksijo, po 48-50 dneh dermalnega nanašanja 100 mg/kg tm kumafosa pa popolno paralizo. Pri kokoših, ki so 90 dni prejemale kumafos (oralno ali dermalno) so ugotovili delno izboljšanje po prenehanju izpostavitve kumafosu. Pri živalih, ki so kumafos zaužile, niso opazili histopatoloških sprememb perifernih živcev ali hrbtenjače. Histopatoloških sprememb tudi niso

opazili na perifernih živcih kokoši, ki so preko kože bile izpostavljene kumafosu. Polovica živali je imela histopatološke spremembe hrbtenjače, medtem, ko so pri drugi polovici opazili nejasne spremembe (equivocal) hrbtenjače oz. sprememb niso zaznali. Na podlagi rezultatov so v tej študiji zaključili, da kumafos lahko povzroči zakasnelo nevrotoksičnost po dermalni aplikaciji (JMPR, 1990).

V drugi študiji so kokoši (nesnice Leghorn) prejele 50 mg/kg tm kumafosa (raztopljenega v deionizirani vodi), čez tri tedne pa so prejele še en odmerek kumafosa, 100 mg/kg tm. Kljub temu, da so jim dajali atropine, so 4/30 poginile po prvem odmerku in 3/26 po drugem. Pri vseh živalih so opazili holinergični sindrom in nenormalno hojo do 42. dne po prvem tretiranju, ne pa ataksije. S histopatološkim pregledom šestih naključno izbranih živali niso dokazali degeneracije perifernih živcev, lumbarne hrbtenjače, podaljšana hrbtenjača in mali možgani niso bili prizadeti. Nekatere spremembe, ki so jih opazili v torkalnem in cervikalnem delu hrbtenjače so bile podobne spremembam v kontrolni skupini. V tej študiji je kot pozitivna kontrola služil TOCP (triortokrezilfosfat), ki ni povzročil holinergičnega sindroma, ampak znake zakasnele nevrotoksičnosti, ki so jih opazili 10. dan po tretiranju in so se razvili v popolno paralizo v roku 16-20 dni po tretiranju s TOCP. Visoki odmerki kumafosa, ki so povzročili hud holinergični sindrom torej niso povzročili zakasnele nevrotoksičnosti (JMPR, 1990).

Da bi ugotovili ali kumafos povzroča zakasnelo nevrotoksičnost so v eni študiji merili aktivnost NTE (iz angl. *neuropathy target esterase*) v živčevju izpostavljenih kokoši. Kokoši so dobile enkratni odmerek 100 mg/kg tm z gavažo ali so bile izpostavljene dermalnemu nanosu 500 mg/kg tm. Živali so usmrtili 24 in 48 ur po izpostavitvi kumafosu in izmerili NTE v možganih in hrbtenjači. V eni od kokoši, ki so oralno prejele kumafos so izmerili 60 % znižano aktivnost NTE v možganih in hrbtenjači. Pri drugih dveh kokoših je bila aktivnost NTE v obeh tkivih znižana 20-30 %. Pri kokoših, ki so prejele kumafos dermalno je bila aktivnost NTE znižana manj kot 10 %. Opisana študija ni bila opravljena popolnoma v skladu s smernico OECD. Aktivnost NTE ni bila izmerjena v perifernih tkivih in histološki pregled ni bil opravljen po 21 dneh, ko se ponavadi pojavijo znaki zakasnele nevrotoksičnosti (JMPR, 1990).

Na podlagi vseh razpoložljivih podatkov menimo, da obstaja sum, da kumafos povzroča zakasnelo nevrotoksičnost.

#### 2.1.2.4.5 Učinki na razmnoževanje in potomstvo

Vpliv kumafosa na razmnoževanje in razvoj potomstva so preučevali v dvogeneracijski študiji na podganah. Živali so uživale krmo z 0,05; 0,25 in 1,25 mg/kg tm/dan kumafosa. V tej študiji kumafos ni vplival na razmnoževanje. Ugotovili pa so, da je bil znižan delež živorojenih moških potomcev prve in druge generacije v skupini, ki je uživala 1,25 mg/kg tm/dan kumafosa. V skupini, ki je prejela srednji in nizki odmerek kumafosa, 0,05 in 0,25 mg/kg tm/dan, niso opazili spremembe deleža spolov. V študiji so ugotovili statistično značilno znižanje aktivnosti možganske AChE pri odraslih samicah obeh generacij, izpostavljenih visokemu odmerku kumafosa. Statistično značilno znižanje plazemske in eritrocitne AChE so izmerili pri odraslih živalih obeh generacij, ki so uživale srednji in visok odmerek kumafosa, ter pri mladičih, ki so bili izpostavljeni visokemu odmerku kumafosa. V študiji so določili NOAEL 0,25 mg/kg tm/dan zaradi znižanja možganske AChE (EMEA, 2001). Po današnjih merilih bi določili NOAEL za starše 0,25 mg/kg tm/dan, NOAEL za razmnoževanje 1,25 mg/kg tm/dan, in NOAEL za zarod 0,25 mg/kg tm/dan zaradi znižanega deleža živorojenih samcev pri visokem odmerku.

Objavljena je še ena dvogeneracijska študija na podganah, kjer so opazovali vpliv na razmnoževanje in inhibicijo AChE (Astroff s sod., 1998). V študiji so podgane (30/spol/odmerek) prejemale 1, 5 in 25



ppm kumafosa, kar je enako povprečnemu dnevnu vnosu 0; 0,06; 0,30 in 1,76 mg/kg tm. Tudi v tej študiji niso opazili vpliva kumafosa na razmnoževanje, niti niso poročali o vplivu kumafosa na razmerje živorojenih mladičev. Pri starših obeh generacij so opazili znižano aktivnost plazemske AChE pri visokem odmerku in eritrocitne pri srednjem in visokem odmerku. Pri mladičih prve generacije po 4 dneh niso opazili vpliva kumafosa na aktivnost plazemske, eritrocitne ali možganske AChE. Pri samicah druge generacije, ki so bile izpostavljene visokemu odmerku, je bila po štirih dneh znižana aktivnost eritrocitne AChE. Po 21 dneh mladiči niso bili izpostavljeni kumafosu samo preko materinega mleka, ampak so tudi že uživali hrano. Takrat so pri mladičih prve generacije, izpostavljene visokemu odmerku, izmerili znižane aktivnosti plazemske in eritrocitne AChE pri obeh spolih in možganske pri samicah. Pri samicah druge generacije, izpostavljene visokemu odmerku kumafosa, je bila znižana aktivnost plazemske AChE. Aktivnosti AChE so bile pri mladičih znižane manj kot 10 %. V tej študiji bi določili NOAEL za razmnoževanje 1,76 mg/kg tm/dan, NOAEL za starše 0,06 mg/kg tm/dan, saj so pri starših izmerili več kot 20 % znižanje AChE pri 5 ppm, in NOAEL za zarod 1,76 mg/kg tm/dan.

Kumafos lahko prehaja placento, so ugotovili v študiji na miših, ki so s krmo prejele 100 mg/kg tm/dan kumafosa. Pri tem odmerku je bilo brejih manj samic, število zarodkov v leglu je bilo manjše, manjše pa je bilo tudi preživetje zarodkov. Odmerek kumafosa 1,25 mg/kg tm/dan ni vplival na razmnoževanje miši (Exttoxnet).

Teratogenost kumafosa so določali v študijah na brejih podganah in kuncih. Podgane Charles River CD BS (50 na odmerek) so izpostavili 0, 1, 5 in 25 mg/kg tm/dan kumafosa, od 6. do 15. dneva brejosti. Pri 25 mg/kg m/dan so opazili tremor, pri nižjih odmerkih niso opazili kliničnih znakov. Kumafos ni povzročil povečanega pojavljanja variacij ali malformacij pri zarodkih. V tej študiji so določili NOAEL za matere 5 mg/kg tm/dan in NOAEL za razvojno strupenost > 25 mg/kg tm/dan, saj niso opazili nobenih učinkov na zarodke pri uporabljenih odmerkih (US EPA, 1989).

Vpliv kumafosa na razvoj zarodkov so študirali tudi pri kuncih. Po 17 brejih samic na odmerek so izpostavili 0, 0,25; 2 in 18 mg/kg tm/dan kumafosa, od 7. do 19. dne brejosti. Pri več samicah, ki so prejele 18 mg/kg tm/dan kumafosa so poročali o holinergičnih učinkih. Vplivov kumafosa na pojav nepravilnosti pri zarodkih niso opazili. NOAEL za matere so določili pri 2 mg/kg tm/dan, NOAEL za razvoj zarodkov je > 18 mg/kg tm/dan, torej več kot najvišji uporabljen odmerek (US EPA, 1989).

Pri nobeni vrsti niso opazili povečanega pojavljanja razvojnih malformacij ali variacij kljub očitni toksičnosti kumafosa za matere. EMEA (EMEA, 2001) povzema še, da so pri zarodkih podgan in kuncev opazili znižani delež moških potomcev. Pri podganah je bil ta učinek opažen pri odmerku 5 mg/kg tm/dan in več, pri kuncih pa le pri najvišjem odmerku 18 mg/kg tm/dan (EMEA, 2001). Na podlagi teh ugotovitev so predlagali NOAEL za razvoj zarodkov podgan 1 mg/kg tm/dan in za kunce 2 mg/kg tm/dan. V tem primeru bi bilo kumafos potrebno razvrstiti tudi kot strupen za razvoj zarodkov. Kot že večkrat omenjeno, poročil o študijah ne moremo neodvisno oceniti, saj do njih ne dostopamo.

#### 2.1.2.4.6 Razvrstitev kumafosa

Razvrščanje, označevanje in pakiranje nevarnih snovi in zmesi določa Uredba (ES) št. 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 kumafos obstaja usklajena razvrstitev v Aneksu VI Uredbe 1272/2008, ki je *Akutno toksičen kat. 2, H300 Smrtno pri zaužitju, Akutno toksičen kat. 4, H312 Škodljivo v stiku s kožo*.

Predlagane razvrstitve ne moremo komentirati, ker ne razpolagamo s poročili študij, ampak le z njihovimi povzetki, ki so javno dostopni.

#### 2.1.2.4.7 Kritični odmerek in referenčni (varni) odmerki

ADI je določen na podlagi najnižjega odmerka kumafosa (NOAEL), ki v študijah dlje trajajoče ponavljajoče se izpostavljenosti poskusnih živali, pri najbolj občutljivi vrsti ni povzročil škodljivega učinka.

ARfD je določen na podlagi najnižjega odmerka kumafosa (NOAEL), ki v študijah kratkotrajne izpostavljenosti poskusnih živali, pri najbolj občutljivi vrsti ni povzročil škodljivega učinka.

Študije akutne strupenosti, ki so bile opravljene s kumafosom, niso take, da bi lahko v njih določili akutni NOAEL, ki bi bil osnova za izračun ARfD. V tabeli 2 povzemamo študije ponavljajoče izpostavljenosti kumafosu, ki bi bile primerne za določitev referenčne vrednosti. Kot že prej omenjeno posameznih študij nismo ocenjevali, saj ne razpolagamo z njimi, smo pa povzeli ocene, ki so jih pripravile različne strokovne organizacije na podlagi mnenj strokovnjakov.

Tabela 2. Povzetek toksikoloških študij za določitev referenčnih odmerkov

Študija/odmerki	NOAEL	LOAEL	Učinki pri LOAEL	Vir
90-dnevna študija na psu, prehranski vnos; 0; 0,25; 1,25 in 2,5 mg/kg tm/dan	Ni bil določen	0,25 mg/kg tm/dan	Inhibicija serumske AChE po dveh tednih	JMPR, 1968
Enoletna prehranska študija na psu; 0; 0,025; 0,75 in 2,25 mg/kg tm/dan	0,025 mg/g tm/dan	0,75 mg/kg tm/dan	Inhibicija eritrocitne AChE	EMEA, 2001
Enoletna prehranska študija na psu; 0; 0,05; 0,25 in 1,25 mg/kg tm/dan	0,05 mg/g tm/dan	0,25 mg/kg tm/dan	Inhibicija serumske AChE	JMPR, 1968
Kronična študija na podganah, 2 leti, 0; 0,33; 0,66; 1,65 in 6,6 mg/kg tm/dan	0,33 mg/kg tm/dan	0,66 mg/kg tm/dan	Inhibicija serumske in eritrocitne AChE	JMPR, 1968
Kronična študija na podganah (F-344), 2 leti, 0; 0,5 in 1 mg/kg tm/dan	Ni bil določen	0,5 mg/kg tm/dan	Povišano pojavljanje levkemij pri samicah	EMEA, 2001
Kronična študija na podganah (bor:WISW), 2 leti, 0; 0,05; 0,25 in 1,25 mg/kg tm/dan	1,25 mg/kg tm/dan	Ni bil določen	/	EMEA, 2001

Študija/odmerki	NOAEL	LOAEL	Učinki pri LOAEL	Vir
Kronična študija na miših (B6C3F1), 2 leti, 0, 1 in 2 mg/kg tm/dan	Ni bil določen	1 mg/kg tm/dan	Povečano število malignih tumorjev, hepatocelularnih karcinomov, karcinomov/adenokarcinomov dojke in alveolarnih/bronhialnih adenomov	EMEA, 2001
Dvogeneracijska študija na podganah, 0; 0,05; 0,25 in 1,25 mg/kg tm/dan	Za starše: 0,25 Za razmnoževanje: 1,25 Za zarod: 0,25	Za starše: 1,25 Za razmnoževanje: ni določen Za zarod: 1,25	Starši: ↓ aktivnost možganske AChE pri obeh generacijah Zarod: znižan delež živorojenih samcev	EMEA, 2001
Dvogeneracijska študija na podganah, 0; 0,06; 0,30 in 1,76 mg/kg tm/dan	Za starše: 0,06 Za razmnoževanje: 1,76 Za zarod: 1,76	Za starše: 0,30 Za razmnoževanje: ni določen Za zarod: ni določen	Starši: ↓ aktivnost plazemske in eritrocitne AChE pri obeh generacijah	Astroff s sod., 1998
Študija strupenosti za razvoj na podganah, 0, 1, 5 in 25 mg/kg tm/dan	Za starše: 5 mg/kg tm/dan Za razvoj zarodkov: 1 mg/kg tm/dan	Za starše: 25 mg/kg tm/dan Za razvoj zarodkov: 5 mg/kg tm/dan	Starši: tremor Zarod: znižan delež moških potomcev	EMEA, 2001
Študija razvojne strupenosti na kuncih, 0; 0,25; 2 in 18 mg/kg tm/dan	Za starše: 2 mg/kg tm/dan Za razvoj zarodkov: 2 mg/kg tm/dan	Za starše: 18 mg/kg tm/dan Za razvoj zarodkov: 18 mg/kg tm/dan	Starši: holinergični učinki Zarod: znižan delež moških potomcev	EMEA, 2001

Znižanje aktivnosti plazemske, eritrocitne in možganske acetilholinesteraze je kritični učinek, ki so ga opazili v študijah akutne in ponavljajoče se izpostavljenosti kumafosu tako pri človeku kot pri drugih sesalcih.

V preteklosti so bile za kumafos že predlagane različne referenčne vrednosti (Tabela 3).



Tabela 3. Pregled referenčnih vrednosti za kumafos.

Referenčna vrednost	NOAEL/LOEAL na katerem Referenčna vrednost/učinki pri LOAEL temelji	Faktor ocenjevanja	Vir
ARfD = 0,002 mg/kg tm/dan	LOAEL = 2 mg/kg tm/dan, inhibicija eritrocitne AChE, študija akutne nevrotoksičnosti, podgana	1000 10- medvrstne razlike v TK in TD 10- razlike v TK in TD med osebki iste vrste 10 – uporaba LOAEL, možnost zakasnele nevrotoksičnosti*	Health Canada Pest Management Regulatory Agency (PACR, 2003)
ADI = 0,0003 mg/kg tm/dan	NOAEL = 0,3 mg/kg tm/dan, inhibicija možganske AChE, 2-generacijska študija podgana	1000 10- medvrstne razlike v TK in TD 10- razlike v TK in TD med osebki iste vrste 10 – ni primerne študije rakotvornosti na miših***	Pest Management Regulatory Agency Health Canada (PACR, 2003)
ADI = 0,00025 mg/kg tm/dan	NOAEL = 0,025 mg/kg tm/dan, Inhibicija eritrocitne AChE, 1-letna študija na psu	100 10- medvrstne razlike v TK in TD 10- razlike v TK in TD med osebki iste vrste	EMEA, 2001
Začasen ADI = 0,0005 mg/kg tm/dan	NOAEL = 0,05 mg/kg tm/dan, inhibicija AChE, 12-tedenska študija na psih	100 10- medvrstne razlike v TK in TD 10- razlike v TK in TD med osebki iste vrste	Določen 1968 (JMPR, 1968), preklican 1980 (JMPR, 1980)

\*- kumafos je v nekaterih študijah pri kokoših povzročil zakasnele nevrotoksične učinke. Za določitev referenčnega odmerka se uporablja študija na glodavcih, ki so manj občutljivi na te učinke kot kokoši in zato je bil pri izračunu referenčne vrednosti upoštevan dodatni faktor ocenjevanja.

\*\*- ocenjevalci so menili, da v študiji rakotvornosti ni bil uporabljen najvišji odmerek, ki ga miši še tolerirajo (MTD- iz angl. *maximum tolerated dose*) in torej potencialnega rakotvornega delovanja kumafosa pri miših ne moremo izključiti. To negotovost so upoštevali z uporabo dodatnega faktorja ocenjevanja pri izračunu referenčnega odmerka.

JMPR je leta 1968 določil začasno vrednost ADI za kumafos, saj niso bili na voljo podatki, na podlagi katerih bi lahko določili ADI (JMPR, 1968). Leta 1980 je JMPR začasni ADI preklical iz istega razloga

(JMPR, 1980). Ponovno oceno kumafosa je JMPR pripravil še leta 1987 in 1990 (JMPR, 1987, 1990). Ocenili so študije, ki so bile medtem predložene in zaključili, da ADI ni moč določiti saj niso bile izvedene in predložene študije strupenosti za razvoj zarodkov na podganah in kuncih, niti dvogeneracijska študija v kateri bi preučevali vpliv kumafosa na razmnoževanje in razvoj zarodkov.

Manjkajoče študije, ki jih navaja ocena JMPR iz leta 1990 so bile izvedene in ocenjene, kot navajajo v nekaterih drugih ocenah kumafosa (EMEA, 2001, US EPA, 1996).

Najnižji ADI je določila Evropska agencija za zdravila in sicer 0,00025 mg/kg tm/dan. Vrednost temelji na NOAEL 0,025 mg/kg tm/dan iz enoletne študije na psu ob uporabi faktorja ocenjevanja 100.

Akutno referenčno vrednost za kumafos je predlagala le kanadska agencija in to 0,002 mg/kg tm/dan. Vrednost je izračunana iz LOAEL, določenega v študiji akutne nevrotoksičnosti na podgani, ob upoštevanju faktorja ocenjevanja 100 za razlike med vrstami in med osebki znotraj vrste, ter dodatnim faktorjem 10 zaradi upoštevanja odmerka, ki je povzročil učinke v poskusnih živalih in suma, da povzroča kumafos zakasnelo nevrotoksičnost. Povzetka akutne študije nevrotoksičnosti, iz katere izhaja ARfD v javno dostopnih virih nismo zasledili, a ker bolj primerne študije za določitev ARfD nismo našli in ker je določena ARfD dovolj konzervativna za opažene učinke v študijah strupenosti za razvoj zarodkov, se nam zdi najbolj primerna za oceno tveganja za kumafos v propolisu.

Pri identifikaciji in karakterizaciji nevarnosti kumafosa nismo ocenjevali študij, ampak smo zbrali in povzeli javno dostopne podatke o študijah. Na podlagi razpoložljivih podatkov smo se odločili, da omenjeni referenčni vrednosti uporabimo pri oceni tveganja.

## **2.2 Ocena izpostavljenosti**

Izpostavljenost smo ocenjevali za posamezne odvzete vzorce z upoštevanjem analiznih vsebnosti amitraza in kumafosa ter z upoštevanjem priporočenih količin za uživanje. Izpostavljenost smo ocenili za odraslo populacijo (telesna masa 70 kg) ter zgolj hipotetično za malčke (otroci od enega do 7 treh let, telesna masa 12 kg) (EFSA, 2012). Izdelki namreč vsebujejo etanol, zato za otroke niso primerni.

Pri odvzemu vzorcev so inšpektorji UVHVVR pridobili tudi podatke o pripravi tinkture propolisa, priporočenih dnevni odmerkih in morebitnih opozorilih (Tabela 4). Potrošnikom se propolis trži v kapalnih stekleničkah, kar omogoča odmerjanje v majhnih količinskih enotah – kapljicah. Odvzete tinkture propolisa se razlikujejo po načinu priprave (glej Tabelo 4), zato smo zaradi pridobitve podatkov o predvidenih zaužitih količinah propolisa glede na priporočeni dnevni odmerek, dodatno zaprosili NLZOH, da so z laboratorijsko merilno zanesljivostjo stehali enake količine (20 kapljic) odvzetih tinktur propolisa. Izmerjene mase navajamo ob vsakem vzorcu v nadaljevanju.

Tabela 4. Pridobljeni podatki proizvajalcev glede priprave tinkture propolisa, priporočenih dnevnih odmerkih ter opozoril pri uživanju (UVHVVR, 2016).

Št. vzorca (NIJZ)	Kodna št. vrečke	Priprava tinkture propolisa	Priporočeni dnevni odmerek	Dodatna opozorila
<b>OT-1</b>	4067	300 g propolisa v 1 liter alkohola (domače žganje).	1-2 kapljici oz. 1 potisk spreja  (ustno navodilo)	Ni opozoril.
<b>OT-2</b>	10902943	40g propolisa v 1,5 litra 80% alkohola ter 0,5 litra vode.	40 kapljic dnevno	Ne priporoča otrokom mlajšim od 3 let.
<b>OT-3</b>	10925171	10% alkoholna raztopina propolisa.	8-12 kapljic dnevno (2x-3x dnevno po 4 kapljice na košček sladkorja ali žlico medu).	Ne priporoča uporabe za otroke, nosečnice in osebe, ki so alergične na propolis.
<b>OT-4</b>	20902	15% propolis tinktura (propolis in 96% etanol).	1-2x na dan po 10 kapljic na kocki sladkorja ali na kruhu.	Ni opozoril.
<b>OT-5</b>	10717899	20% raztopina propolisa.	1-2x na dan 5 kapljic na čajno žličko sladkorja ob bolečem grlu. Za herpes: 1-3x na dan 1 kapljica na vatirno palčko s katero se namaže herpes (ustna navodila)	Ni opozoril.

## 2.2.1 Izpostavljenost amitrazu preko vzorcev tinkture propolisa

### 2.2.1.1 Vzorec tinkture propolisa OT-1

(kodna številka vrečke 4067, številka vzorca NLZOH 16/02679)

Ugotovljena vsebnost amitraza znaša  $1,1 \pm 0,6$  mg/kg. Priporočeni dnevni odmerek v navodilih proizvajalca ni jasno določen (1-2 kapljici, brez časovne omejitve), zato smo kot največji dnevni vnos predpostavili 40 kapljic, ker je bil to največji priporočeni dnevni odmerek med odvzetimi vzorci. Masa 20 kapljic tinkture znaša 0,9037 g.

Izračunana izpostavljenost amitrazu za odrasle ( $m = 70$  kg) je z upoštevanjem merilne negotovosti analize meritve v območju med 0,014 in 0,043  $\mu\text{g}/\text{kg}$   $m/\text{dan}$ , za malčke ( $m = 12$  kg) pa v območju 0,083 - 0,249  $\mu\text{g}/\text{kg}$   $m/\text{dan}$ .

#### 2.2.1.2 Vzorec tinkture propolisa OT-2

(kodna številka vrečke 10902943, številka vzorca NLZOH 16/02847)

Ugotovljena vsebnost amitraza znaša  $2,2 \pm 1,1$  mg/kg. Priporočeni dnevni odmerek je 40 kapljic, kar je tudi predpostavljeni največji, še priporočeni, dnevni vnos. Masa 20 kapljic tinkture znaša 0,7789 g.

Izračunana izpostavljenost amitrazu za odrasle (tm = 70 kg) je z upoštevanjem merilne negotovosti analizne meritve v območju med 0,024 in 0,073  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tm/dan, za malčke (tm = 12 kg) pa v območju 0,14 - 0,43  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tm/dan.

#### 2.2.1.3 Vzorec tinkture propolisa OT-3

(kodna številka vrečke 10925171, številka vzorca NLZOH 16/02850)

Ugotovljena vsebnost amitraza znaša  $2,4 \pm 1,2$  mg/kg. Priporočeni dnevni odmerek je od 8 do 12 kapljic, zato smo predpostavili 12 kapljic kot največji, še priporočeni, dnevni vnos. Masa 20 kapljic tinkture znaša 0,3355 g.

Izračunana izpostavljenost amitrazu za odrasle (tm = 70 kg) je z upoštevanjem merilne negotovosti analizne meritve v območju med 0,003 in 0,010  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tm/dan, za malčke (tm = 12 kg) pa v območju 0,020 - 0,060  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tm/dan.

#### 2.2.1.4 Vzorec tinkture propolisa OT-4

(kodna številka vrečke 20902, številka vzorca NLZOH 16/02945)

Ugotovljena vsebnost amitraza znaša  $2,0 \pm 1,0$  mg/kg. Priporočeni dnevni odmerek je 1-2x na dan po 10 kapljic, zato smo predpostavili 20 kapljic kot največji, še priporočeni, dnevni vnos. Masa 20 kapljic tinkture znaša 0,4979 g.

Izračunana izpostavljenost amitrazu za odrasle (tm = 70 kg) je z upoštevanjem merilne negotovosti analizne meritve v območju med 0,007 in 0,021  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tm/dan, za malčke (tm = 12 kg) pa v območju 0,041 - 0,12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tm/dan.

#### 2.2.1.5 Vzorec tinkture propolisa OT-5

(kodna številka vrečke 10717899, številka vzorca NLZOH 16/02998)

Ugotovljena vsebnost amitraza znaša  $2,1 \pm 1,1$  mg/kg. Priporočeni dnevni odmerek je 1-2x na dan po 5 kapljic, zato smo predpostavili 10 kapljic kot največji, še priporočeni, dnevni vnos. Masa 20 kapljic tinkture znaša 0,8406 g.

Izračunana izpostavljenost amitrazu za odrasle (tm = 70 kg) je z upoštevanjem merilne negotovosti analizne meritve v območju med 0,006 in 0,019  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tm/dan, za malčke (tm = 12 kg) pa v območju 0,037 - 0,11  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tm/dan.

## **2.2.2 Izpostavljenost kumafosu preko vzorcev tinkture propolisa**

### **2.2.2.1 Vzorec tinkture propolisa OT-1**

(kodna številka vrečke 4067, številka vzorca NLZOH 16/02679)

Ugotovljena vsebnost kumafosa je pod mejo določljivosti 0,25 mg/kg. Izpostavljenost smo izračunali tako, kot da bi bila vsebnost kumafosa v vzorcu tinkture propolisa na meji določljivosti analizne metode. Priporočeni dnevni odmerek ni jasno določen (1-2 kapljici, brez časovne omejitve), zato smo kot največji dnevni vnos predpostavili 40 kapljic, ker je bil to največji priporočeni dnevni odmerek med odvzetimi vzorci. Masa 20 kapljic tinkture znaša 0,9037 g.

Izračunana izpostavljenost kumafosu za odrasle ( $t_m = 70$  kg) je z upoštevanjem merilne negotovosti analizne meritve v območju med 0,003 in 0,009  $\mu\text{g}/\text{kg}$   $t_m/\text{dan}$ , za malčke ( $t_m = 12$  kg) pa v območju 0,019 - 0,056  $\mu\text{g}/\text{kg}$   $t_m/\text{dan}$ .

### **2.2.2.2 Vzorec tinkture propolisa OT-2**

(kodna številka vrečke 10902943, številka vzorca NLZOH 16/02847)

Ugotovljena vsebnost kumafosa je pod mejo določljivosti 0,25 mg/kg. Izpostavljenost smo izračunali tako, kot da bi bila vsebnost kumafosa v vzorcu tinkture propolisa na meji določljivosti. Priporočeni dnevni odmerek je 40 kapljic, kar je tudi predpostavljeno največji dnevni vnos. Masa 20 kapljic tinkture znaša 0,7789 g.

Izračunana izpostavljenost kumafosu za odrasle ( $t_m = 70$  kg) je z upoštevanjem merilne negotovosti analizne meritve v območju med 0,003 in 0,008  $\mu\text{g}/\text{kg}$   $t_m/\text{dan}$ , za malčke ( $t_m = 12$  kg) pa v območju 0,016 - 0,049  $\mu\text{g}/\text{kg}$   $t_m/\text{dan}$ .

### **2.2.2.3 Vzorec tinkture propolisa OT-3**

(kodna številka vrečke 10925171, številka vzorca NLZOH 16/02850)

Ugotovljena vsebnost kumafosa znaša  $12 \pm 6$  mg/kg. Priporočeni dnevni odmerek je od 8 do 12 kapljic, zato smo predpostavili 12 kapljic kot največji, še priporočeni, dnevni vnos. Masa 20 kapljic tinkture znaša 0,3355 g.

Izračunana izpostavljenost kumafosu za odrasle ( $t_m = 70$  kg) je z upoštevanjem merilne negotovosti analizne meritve v območju med 0,017 in 0,052  $\mu\text{g}/\text{kg}$   $t_m/\text{dan}$ , za malčke ( $t_m = 12$  kg) pa v območju 0,10 - 0,30  $\mu\text{g}/\text{kg}$   $t_m/\text{dan}$ .

### **2.2.2.4 Vzorec tinkture propolisa OT-4**

(kodna številka vrečke 20902, številka vzorca NLZOH 16/02945)

Ugotovljena vsebnost kumafosa znaša  $0,47 \pm 0,24$  mg/kg. Priporočeni dnevni odmerek je 1-2x na dan po 10 kapljic, zato smo predpostavili 20 kapljic kot največji, še priporočeni, dnevni vnos. Masa 20 kapljic tinkture znaša 0,4979 g.

Izračunana izpostavljenost kumafosu za odrasle (tm = 70 kg) je z upoštevanjem merilne negotovosti analizne meritve v območju med 0,002 in 0,005 µg/kg tm/dan, za malčke (tm = 12 kg) pa v območju 0,010 - 0,029 µg/kg tm/dan.

#### 2.2.2.5 Vzorec tinkture propolisa OT-5

(kodna številka vrečke 10717899, številka vzorca NLZOH 16/02998)

Ugotovljena vsebnost kumafosa znaša  $3,0 \pm 1,5$  mg/kg. Priporočeni dnevni odmerek je 1-2x na dan po 5 kapljic, zato smo 10 kapljic predpostavili kot največji, še priporočeni, dnevni vnos. Masa 20 kapljic tinkture znaša 0,8406 g.

Izračunana izpostavljenost kumafosu za odrasle (tm = 70 kg) je z upoštevanjem merilne negotovosti analizne meritve v območju med 0,009 in 0,027 µg/kg tm/dan, za malčke (tm = 12 kg) pa v območju 0,052 - 0,16 µg/kg tm/dan.

## 2.3 Opredelitev tveganja

*Pri opredelitvi tveganja smo primerjali izračunane izpostavljenosti z referenčnimi vrednostmi ARfD in ADI za amitraz in kumafos in ocenili tveganje za zdravje. Poleg tega smo izračunali tudi tisto zaužito količino tinktur propolisa, ki bi vodila v preseganje referenčnih vrednosti. Rezultati tega poglavja so pregledno zbrani v Tabeli 5. Etilni alkohol predstavlja večinski delež vzorčenih tinktur propolisa. Alkoholne tinkture niso primerne za otroke in jih v oceni tveganja navajamo le hipotetično.*

### 2.3.1 Opredelitev tveganja glede ostankov amitraza v odvzetih vzorcih tinktur propolisa

#### 2.3.1.1 Vzorec tinkture propolisa OT-1

Na podlagi ugotovljene vsebnosti amitraza v vzorcu tinkture propolisa in največje predpostavljene dnevne količine, izračunana kratkotrajna izpostavljenost amitrazu predstavlja največ 0,43 % akutnega referenčnega odmerka za odrasle (ARfD; 0,01mg/kg) ter največ 2,5 % ARfD za malčke.

Dolgotrajna izračunana izpostavljenost amitrazu predstavlja največ 1,4 % sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI; 0,003 mg/kg) ter največ 8,3 % ADI za malčke.

Do tveganja za zdravje ljudi zaradi vsebnosti amitraza bi pri odraslih prišlo ob enkratnem zaužitju 636g (preko 14000 kapljic) vzorca tinkture propolisa ter v daljšem časovnem obdobju ob dnevnem zaužitju 190 g (preko 4000 kapljic) vzorca tinkture propolisa.

***Vzorec tinkture propolisa OT-1*** (kodna številka vrečke 4067, številka vzorca NLZOH 16/02679) z ostanki amitraza ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi ob kratkotrajnem ali dolgotrajnem uživanju priporočenih količin.

### 2.3.1.2 Vzorec tinkture propolisa OT-2

Na podlagi ugotovljene vsebnosti amitraza v vzorcu tinkture propolisa in največje priporočene dnevne količine, izračunana kratkotrajna izpostavljenost amitrazu predstavlja največ 0,73 % akutnega referenčnega odmerka za odrasle (ARfD, 0,01mg/kg) ter največ 4,3% ARfD za malčke.

Dolgotrajna izračunana izpostavljenost amitrazu predstavlja največ 2,4% sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI; 0,003 mg/kg) ter največ 14% ADI za malčke.

Do tveganja za zdravje ljudi zaradi vsebnosti amitraza bi pri odraslih prišlo ob enkratnem zaužitju 318g (preko 8000 kapljic) vzorca tinkture propolisa ter v daljšem časovnem obdobju ob dnevnem zaužitju 95g (preko 2000 kapljic) vzorca tinkture propolisa.

***Vzorec tinkture propolisa OT-2 (kodna številka vrečke 10902943, številka vzorca NLZOH 16/02847) z ostanki amitraza ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi ob kratkotrajnem ali dolgotrajnem uživanju priporočenih količin.***

### 2.3.1.3 Vzorec tinkture propolisa OT-3

Na podlagi ugotovljene vsebnosti amitraza v vzorcu tinkture propolisa in največje priporočene dnevne količine, izračunana kratkotrajna izpostavljenost amitrazu predstavlja največ 0,10 % akutnega referenčnega odmerka za odrasle (ARfD, 0,01mg/kg) ter največ 0,60% ARfD za malčke.

Dolgotrajna izračunana izpostavljenost amitrazu predstavlja največ 0,34% sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI; 0,003 mg/kg) ter največ 2,0% ADI za malčke.

Do tveganja za zdravje ljudi zaradi vsebnosti amitraza bi pri odraslih prišlo ob enkratnem zaužitju 292g (preko 17000 kapljic) vzorca tinkture propolisa ter v daljšem časovnem obdobju ob dnevnem zaužitju 87g (preko 5000 kapljic) vzorca tinkture propolisa.

***Vzorec tinkture propolisa OT-3 (kodna številka vrečke 10925171, številka vzorca NLZOH 16/02850) z ostanki amitraza ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi ob kratkotrajnem ali dolgotrajnem uživanju priporočenih količin.***

### 2.3.1.4 Vzorec tinkture propolisa OT- 4

Na podlagi ugotovljene vsebnosti amitraza v vzorcu tinkture propolisa in največje priporočene dnevne količine, izračunana kratkotrajna izpostavljenost amitrazu predstavlja največ 0,21 % akutnega referenčnega odmerka za odrasle (ARfD, 0,01mg/kg) ter največ 1,2% ARfD za malčke.

Dolgotrajna izračunana izpostavljenost amitrazu predstavlja največ 0,71% sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI; 0,003 mg/kg) ter največ 4,1% ADI za malčke.

Do tveganja za zdravje ljudi zaradi vsebnosti amitraza bi pri odraslih prišlo ob enkratnem zaužitju 350g (preko 14000 kapljic) vzorca tinkture propolisa ter v daljšem časovnem obdobju ob dnevnem zaužitju 105g (preko 4000 kapljic) vzorca tinkture propolisa.



***Vzorec tinkture propolisa OT-4*** (kodna številka vrečke 20902, številka vzorca NLZOH 16/02945) z ostanki amitraza ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi ob kratkotrajnem ali dolgotrajnem uživanju priporočenih količin.

#### 2.3.1.5 Vzorec tinkture propolisa OT-5

Na podlagi ugotovljene vsebnosti amitraza v vzorcu tinkture propolisa in največje priporočene dnevne količine, izračunana kratkotrajna izpostavljenost amitrazu predstavlja največ 0,19 % akutnega referenčnega odmerka za odrasle (ARfD, 0,01mg/kg) ter največ 1,1% ARfD za malčke.

Dolgotrajna izračunana izpostavljenost amitrazu predstavlja največ 0,63% sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI; 0,003 mg/kg) ter največ 3,7% ADI za malčke.

Do tveganja za zdravje ljudi zaradi vsebnosti amitraza bi pri odraslih prišlo ob enkratnem zaužitju 333g (približno 8000 kapljic) vzorca tinkture propolisa ter v daljšem časovnem obdobju ob dnevnem zaužitju 100g (preko 2000 kapljic) vzorca tinkture propolisa.

***Vzorec tinkture propolisa OT-5*** (kodna številka vrečke 10717899, številka vzorca NLZOH 16/02998) z ostanki amitraza ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi ob kratkotrajnem ali dolgotrajnem uživanju priporočenih količin.

### 2.3.2 Opredelitev tveganja glede ostankov kumafosa v odvzetih vzorcih tinktur propolisa

#### 2.3.2.1 Vzorec tinkture propolisa OT-1

Na podlagi ugotovljene vsebnosti kumafosa v vzorcu tinkture propolisa in največje predpostavljene dnevne količine, izračunana kratkotrajna izpostavljenost kumafosu predstavlja največ 0,48 % akutnega referenčnega odmerka za odrasle (ARfD; 0,002 mg/kg) ter največ 2,8 % ARfD za malčke.

Dolgotrajna izračunana izpostavljenost kumafosu predstavlja največ 3,9 % sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI; 0,00025 mg/kg) ter največ 23 % ADI za malčke.

Do tveganja za zdravje ljudi zaradi vsebnosti kumafosa bi pri odraslih prišlo ob enkratnem zaužitju 560g (preko 12000 kapljic) vzorca tinkture propolisa ter v daljšem časovnem obdobju ob dnevnem zaužitju 70 g (približno 1500 kapljic) vzorca tinkture propolisa.

***Vzorec tinkture propolisa OT-1*** (kodna številka vrečke 4067, številka vzorca NLZOH 16/02679) z ostanki kumafosa ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi ob kratkotrajnem ali dolgotrajnem uživanju priporočenih količin.

#### 2.3.2.2 Vzorec tinkture propolisa OT-2

Na podlagi ugotovljene vsebnosti kumafosa v vzorcu tinkture propolisa in največje priporočene dnevne količine, izračunana kratkotrajna izpostavljenost kumafosu predstavlja največ 0,28 % akutnega referenčnega odmerka za odrasle (ARfD, 0,002 mg/kg) ter največ 1,6 % ARfD za malčke.

Dolgotrajna izračunana izpostavljenost kumafosu predstavlja največ 2,2 % sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI; 0,00025 mg/kg) ter največ 13 % ADI za malčke.



Do tveganja za zdravje ljudi zaradi vsebnosti kumafosa bi pri odraslih prišlo ob enkratnem zaužitju 560 g (preko 14000 kapljic) vzorca tinkture propolisa ter v daljšem časovnem obdobju ob dnevnem zaužitju 70 g (skoraj 1800 kapljic) vzorca tinkture propolisa.

***Vzorec tinkture propolisa OT-2*** (kodna številka vrečke 10902943, številka vzorca NLZOH 16/02847) ***z ostanki kumafosa ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi ob kratkotrajnem ali dolgotrajnem uživanju priporočenih količin.***

#### 2.3.2.3 Vzorec tinkture propolisa OT-3

Na podlagi ugotovljene vsebnosti kumafosa v vzorcu tinkture propolisa in največje priporočene dnevne količine, izračunana kratkotrajna izpostavljenost kumafosu predstavlja največ 2,6 % akutnega referenčnega odmerka za odrasle (ARfD, 0,002 mg/kg) ter največ 15 % ARfD za malčke.

Dolgotrajna izračunana izpostavljenost kumafosu predstavlja največ 20 % sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI; 0,00025 mg/kg) ter največ 120 % ADI za malčke.

Do tveganja za zdravje ljudi zaradi vsebnosti kumafosa bi pri odraslih prišlo ob enkratnem zaužitju 12 g (približno 700 kapljic) vzorca tinkture propolisa ter v daljšem časovnem obdobju ob dnevnem zaužitju 1,4g (približno 90 kapljic) vzorca tinkture propolisa.

***Vzorec tinkture propolisa OT-3*** (kodna številka vrečke 10925171, številka vzorca NLZOH 16/02850) ***z ostanki kumafosa ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi ob kratkotrajnem uživanju priporočenih količin. Ob dolgotrajnem uživanju priporočenih količin obstaja verjetnost tveganja za zdravje pri otrocih, kar je hipotetično, saj naj bi otroci alkoholnih tinktur ne uživali.***

#### 2.3.2.4 Vzorec tinkture propolisa OT- 4

Na podlagi ugotovljene vsebnosti kumafosa v vzorcu tinkture propolisa in največje priporočene dnevne količine, izračunana kratkotrajna izpostavljenost kumafosu predstavlja največ 0,25 % akutnega referenčnega odmerka za odrasle (ARfD, 0,002 mg/kg) ter največ 1,5 % ARfD za malčke.

Dolgotrajna izračunana izpostavljenost kumafosu predstavlja največ 2,0 % sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI; 0,00025 mg/kg) ter največ 12 % ADI za malčke.

Do tveganja za zdravje ljudi zaradi vsebnosti kumafosa bi pri odraslih prišlo ob enkratnem zaužitju 298g (približno 12000 kapljic) vzorca tinkture propolisa ter v daljšem časovnem obdobju ob dnevnem zaužitju 37g (približno 1500 kapljic) vzorca tinkture propolisa.

***Vzorec tinkture propolisa OT-4*** (kodna številka vrečke 20902, številka vzorca NLZOH 16/02945) ***z ostanki kumafosa ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi ob kratkotrajnem ali dolgotrajnem uživanju priporočenih količin.***

#### 2.3.2.5 Vzorec tinkture propolisa OT-5

Na podlagi ugotovljene vsebnosti kumafosa v vzorcu tinkture propolisa in največje priporočene dnevne količine, izračunana kratkotrajna izpostavljenost kumafosu predstavlja največ 1,3 % akutnega referenčnega odmerka za odrasle (ARfD, 0,002 mg/kg) ter največ 7,9 % ARfD za malčke.

Dolgotrajna izračunana izpostavljenost kumafosu predstavlja največ 11 % sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI; 0,00025 mg/kg) ter največ 63 % ADI za malčke.

Do tveganja za zdravje ljudi zaradi vsebnosti kumafosa bi pri odraslih prišlo ob enkratnem zaužitju 47 g (približno 1000 kapljic) vzorca tinkture propolisa ter v daljšem časovnem obdobju ob dnevnem zaužitju 5,8 g (približno 140 kapljic) vzorca tinkture propolisa. ***Vzorec tinkture propolisa OT-5*** (kodna številka vrečke 10717899, številka vzorca NLZOH 16/02998) z ***ostanki kumafosa ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi ob kratkotrajnem ali dolgotrajnem uživanju priporočenih količin.***

Tabela 5. Zbirnik rezultatov ocene tveganja

	AMITRAZ					KUMAFOS				
	Kratkotrajna izpostavljenost % ARfD	Dolgotrajna izpostavljenost % ADI	Ali obstaja tveganje za zdravje?	Izračunana kratkotrajna izpostavljenost v g (kapljicah), ki bi predstavljala tveganje za zdravje	Izračunana dolgotrajna izpostavljenost v g (kapljicah), ki bi predstavljala tveganje za zdravje	Kratkotrajna izpostavljenost % ARfD	Dolgotrajna izpostavljenost % ADI	Ali obstaja tveganje za zdravje?	Izračunana kratkotrajna izpostavljenost v g (kapljicah), ki bi predstavljala tveganje za zdravje	Izračunana dolgotrajna izpostavljenost v g (kapljicah), ki bi predstavljala tveganje za zdravje
<b>OT - 1</b>	0,43 – 2,5	1,4 – 8,3	NE	636 (>14000)	190 (>4000)	0,48 – 2,8	3,9 - 23	NE	560 (>12000)	70 (1500)
<b>OT - 2</b>	0,73 – 4,3	2,4 - 14	NE	318 (>8000)	95(>2000)	0,28 – 1,6	2,2 - 13	NE	560 (>14000)	70 (1800)
<b>OT - 3</b>	0,10 – 0,60	0,34 – 2,0	NE	292 (>17000)	87 (>5000)	2,6 - 15	20 - 120	NE/DA*	12 (700)	1,4 (90)
<b>OT - 4</b>	0,21 – 1,2	0,71 – 4,1	NE	350 (>14000)	105 (>4000)	0,25 – 1,5	2,0 - 12	NE	298 (12000)	37 (1500)
<b>OT - 5</b>	0,19 – 1,1	0,63 – 3,7	NE	333 (>8000)	100 (>2000)	1,3 – 7,9	11 - 63	NE	47 (1000)	5,8 (140)

\*Ob dolgotrajni izpostavljenosti obstaja tveganje za zdravje pri otrocih, kar je hipotetično, saj naj otroci ne bi uživali alkoholnih tinktur.

### 2.3.3 Opredelitev tveganja glede zmesi amitraza in kumafosa v vzorcih tinktur propolisa

Pri opredelitvi tveganja zmesi amitraza in kumafosa 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), ki je povzeto v Fatur in sod., (2016).

Amitraz in kumafos imata različne mehanizme delovanja. Amitraz je agonist adrenergičnih receptorjev  $\alpha$  in antagonist histaminskih receptorjev; v višjih koncentracijah inhibira tudi encima PG sintetazo in MAO. Kumafos je inhibitor encima acetilholinesteraze (glej točki 2.1.1.2 in 2.1.2.2).

Glede na kemijsko strukturo spada amitraz v skupino formamidinskih pesticidov in po svoji strukturi ni podoben kumafosu, ki spada med organofosforne pesticide. Amitraz in kumafos se v organizmih ne kopičita (glej točki 2.1.1.1 in 2.1.2.1).

Podatkov o medsebojnem vplivu amitraza in kumafosa na absorpcijo in izločanje nismo našli. Oba se izdatno presnovita v jetrih s citokromi P450, medtem ko se kumafos delno presnovi že v plazmi s hidrolizo. Amitraz inducira jetrne encime (*in vitro* in pri podganah CYP1A/2, CYP2B1/2B2 in 3A), zaradi česar bi teoretično pričakovali, da se bo kumafos v prisotnosti amitraza hitreje presnovil. Vendar pa kumafos za svojo aktivnost potrebuje metabolno aktivacijo, kar pomeni, da bi indukcija jetrnih encimov lahko povečala raven aktivacije kumafosa. Za kvantitativno opredelitev ali bo prevladal vpliv detoksikacije ali aktivacije v bolj strupeno obliko bi potrebovali kinetične parametre metabolizma kumafosa pri sesalcih in podatke o vpletenosti posameznih podskupin encimov, ki jih v literaturi nismo našli. Po do sedaj 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).

Pri čebelah je bila ugotovljena agonistična interakcija med amitrazom in kumafosom pri visokih (subletalnih) odmerkih (Johnson in sod., 2013). Vendar menimo, da na podlagi izsledkov na čebelah brez primerjave podobnosti oziroma razlik v presnovnih poteh med čebelami in sesalci ni utemeljeno sklepati, da je agonistična interakcija pri čebelah relevantna za ljudi.

Za kemikalije z različnim načinom delovanja ni dokazov, da povzročajo škodljive učinke, v kolikor prisotnost posamezne kemikalije ne presega zanjo določene referenčne vrednosti.

### 3 Ovrednotenje ocene tveganja

#### 3.1 Negotovosti

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

Pri oceni izpostavljenosti amitrazu in kumafosu smo upoštevali le podatke vnosa s propolisom. Izpostavljenost ostankom amitraza kot zdravila za veterinarsko uporabo je možna tudi zaradi uživanja drugih živil živalskega izvora kot so mleko, meso in med. Vendar je po podatkih EFSA ocena celokupne izpostavljenosti potrošnikov, to je vsota izpostavljenosti ostankom amitraza v vseh živilih živalskega izvora, znotraj referenčnih vrednosti. Ob trenutnih zakonskih največjih dovoljenih vrednostih ostankov kumafosa v živilih živalskega izvora, pa bi ocenjena dolgoročna izpostavljenost potrošnikov vsoti ostankov kumafosa presegala sprejemljivi dnevni vnos za 170 %, predvsem zaradi izpostavljenosti preko mleka (EFSA, 2016). Zato je pričakovati spremembe glede uporabe kumafosa v zdravilih za uporabo v veterinarski medicini.

Verjetnost za izpostavljenost amitrazu in kumafosu z uživanjem živil rastlinskega izvora je majhna, ker tako amitraz kot kumafos nista registrirana kot sredstva za zaščito rastlin v EU.

Za natančnejšo opredelitev tveganja zmesi amitraza in kumafosa bi potrebovali kinetične parametre metabolizma in podatke o vpletenih podskupinah presnovnih encimov, ki pa jih za kumafos v literaturi nismo našli.

#### 4 Zaključki in priporočila

Analize vsebnosti ostankov pesticidov v odvzetih vzorcih tinktur propolisa kažejo na prisotnost amitraza in kumafosa in njunih razgradnih produktov nad mejo določanja v propolisu. Ocene tveganja za posamezne odvzete vzorce predpostavljajo kratkotrajno in dolgotrajno uživanje ter odmerjanje v priporočenih količinah. Ugotovljeni ostanki amitraza v odvzetih vzorcih ne predstavljajo tveganja za zdravje ljudi. Ugotovljeni ostanki kumafosa prav tako ne predstavljajo tveganja za zdravje ljudi, razen pri enem vzorcu za otroke, kar pa je hipotetično. V tem vzorcu je bila ugotovljena višja vsebnost kumafosa (12 mg/kg), kar bi ob dolgotrajnem uživanju lahko predstavljalo tveganje za zdravje otrok, pri katerih pa se vnos pripravkov na osnovi alkohola tako ali tako ne priporoča.

Podpiramo redno spremljanje uporabe veterinarskih zdravil skladno s temeljnimi načeli glede uporabe zdravil za zdravljenje živali.

Priporočamo:

- I. nadaljnje spremljanje ostankov veterinarskih zdravil v čebeljih pridelkih;
- II. upoštevanje priporočil EFSA glede mejnih vrednosti ostankov amitraza in kumafosa (0,01 mg/kg) (EFSA, 2016);
- III. ozaveščanje potrošnikov, naj se ob uporabi tinktur propolisa ravnajo po navodilih za uporabo;
- IV. pripravki propolisa v obliki alkoholnih tinktur naj bodo označeni skladno z živilsko zakonodajo in opremljeni z opozorilom, da niso primerni za otroke.

Komunikacija te ocene tveganja naj bo usklajena med ocenjevalci in upravljalci s tveganji.

## 5 Viri

Astroff AB, Freshwater KJ, Eigenberg DA. 1998. Comparative organophosphate-induced effects observed in adult and neonatal Sprague–Dawley rats during the conduct of multigeneration toxicity studies. *Repr Toxicol* 12:619-645.

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.

Christensen CH, Platz EA, Andreotti G, Blair A, Hoppin JA, Koutros S, Lynch CF, Sandler DP, Alavanja MCR. 2010. Coumaphos exposure and incident cancer among male participants in the agricultural health study (AHS). *Env Health Persp* 118:92-96.

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.

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 strani [https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart1\\_2ed\\_en.pdf](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). 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.

EFSA. 2016. Setting of maximum residue levels for amitraz, coumaphos, flumequine, oxytetracycline, permethrin and streptomycin in certain products of animal origin. *EFSA J*; 14(8):4570. Privzeto 16.11.2016 s spletne strani <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2016.4570/epdf>

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](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500010419.pdf)

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), 2001. Committee for veterinary medicinal products Coumafos, Summary Report (2). Privzeto 4.5.2016 s spletne strani [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500013015.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500013015.pdf).

European Commision. Health & Consumer Protection Directorate-General. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (SANCO/12571/2013, 19 November 2013 rev.0). Privzeto 4.5.2016 s spletne strani: [http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance\\_documents/docs/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf)

Extoxnet, Coumaphos. U.S. Public Health Service. Hazardous Substance Data Bank. Washington, DC, 1995.5-9, Privzeto 10.5.2016 s spletne strani <http://extoxnet.orst.edu/pips/coumapho.htm>

Fatur T., Kužner J, Peterlin Mašič L, Kržan M, Filipič M, Perharič L. 2016. Ocena tveganja za zdravje potrošnikov zaradi izpostavljenosti ostankom zdravil za uporabo v veterinarski medicini v medu in satju.

- Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje. Privzeto 10. 5. 2016 s spletne strani: [http://tox.si/attachments/article/198/Ocena%20tveganja%20za%20med\\_VKoncna10\\_02\\_2016.pdf](http://tox.si/attachments/article/198/Ocena%20tveganja%20za%20med_VKoncna10_02_2016.pdf).
- 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.
- HSDB (Hazardous Substances Databank) 1986 (zadnjič posodobljeno 2015) Coumaphos. Privzeto 10.5.2016 s spletne strain: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~Yli2cG:1>.
- 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.
- JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues), 1968. Evaluations of some pesticide residues in food, Coumaphos. Privzeto 9.5.2016 s spletne strain: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v068pr10.htm>.
- JMPR, 1990. Coumaphos Explanation, Evaluation for acceptable intake. Privzeto 9.5.2016 s spletne strani: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v90pr05.htm>.
- 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 strain: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v098pr02.htm>.
- Johnson RM, Dalgren L, Siegfried BD Ellis MD. Acaricide, Fungicide and drug interactions in honeybees (*Apis mellifera*). 2013. *PlosOne*; 8: e54092.
- 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.
- Lee WJ, Colt JS, Heineman EF, McComb R, Weisenburger DD, Lijinsky W, Ward MH. 2005. Agricultural pesticide use and risk of glioma in Nebraska, United States. *Occup Environ Med*, 62:786–792.
- 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.
- Marrs T. 1995. Toxicology of pesticides. V Ballantyne B, Marrs T, Turner P (ur). *General and applied toxicology, Abridged Edition*. Basingstoke: MacMillan Press Ltd.; str. 1199-1212.
- Moser VC, Boyes WK, MacPhail RC. 1987. Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. I. Effects on operant performance. *Fundam Appl Toxicol* 9: 131–139.
- Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, 2016 a. UVHVVR uradni nadzor živil živalskega izvora za 2016, 213a-16/11068-16/02679-V. Maribor, 06.04.2016.
- Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, 2016 b. UVHVVR uradni nadzor živil živalskega izvora za leto 2016, 213a-16/11068-16/02847-V. Maribor, 06.04.2016.



Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, 2016 c. UVHVVR uradni nadzor živil živalskega izvora za leto 2016, 213a-16/11068-16/02850-V. Maribor, 06.04.2016.

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, 2016 d. UVHVVR uradni nadzor živil živalskega izvora za leto 2016, 213a-16/11068-16/02945-V. Maribor, 06.04.2016.

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, 2016 e. UVHVVR uradni nadzor živil živalskega izvora za leto 2016, 213a-16/11068-16/02998-V. Maribor, 06.04.2016.

PACR, 2003. Proposed acceptability for continuing registration, Re-evaluation of coumaphos, Pest Management Regulatory Agency, Health Canada, PACR 2003-04. Privzeto 9.5.2016 s spletne strani: <http://beelab.agro.auth.gr/Data%20Files/Nomothesia/Astheneies&%20Ypolimata/24.%20coumaphos%20ADI.pdf>.

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.

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.

Samec T. 2014. Farmaceutski pogledi na propolis. *Slovenski čebelar* 7-8.

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.

Temple WA, Smith NA. 1989 (nazadnje posodobljeno 1999) *Organophosphorous Pesticides. Poison Information Monograph*. Geneva: International Programme on Chemical Safety. Privzeto 10.5.2016 s spletne strani: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pimg001.htm>.

Timbrell J. 1995. Biotransformation of xenobiotics. V Ballantyne B, Marrs T, Turner P (ur). *General and applied toxicology, Abridged Edition*. Basingstoke: MacMillan Press Ltd.; str. 79-110.

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.

Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, 2016. Dokumentacija ob zaprosilu za pripravo ocene tveganja, elektronski vir pri naročniku, 2016.

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.

US EPA, Coumaphos, 1996. Reregistration Eligibility Document. EPA 738-R-96-014. Washington DC: U.S.



Environmental Protection Agency. Privzeto 9.5.2016 s spletne strani:

<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0018.pdf>.

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](http://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/amitraz_tred.pdf).

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 strain:

[http://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/amitraz\\_tred.pdf](http://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/amitraz_tred.pdf).